

DEMANDE INTERNATIONALE LIÉE EN VERTU DU TRAITE DE COOPERATION EN MATIERE DE BREVETS (PCT)

(51) Classification internationale des brevets ⁶ :C12N 15/86, A61K 35/76, C12N 15/38,
7/01

A1

(11) Numéro de publication internationale:

WO 98/33928

(43) Date de publication internationale:

6 août 1998 (06.08.98)

(21) Numéro de la demande internationale: PCT/FR98/00122

(22) Date de dépôt international: 23 janvier 1998 (23.01.98)

(30) Données relatives à la priorité:

97/01317

31 janvier 1997 (31.01.97)

FR

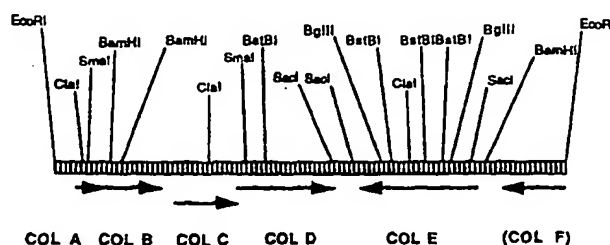
(71) Déposant (pour tous les Etats désignés sauf US): Merial
[FR/FR]; 17, rue Bourgelat, F-69002 Lyon (FR).

(72) Inventeurs; et

(75) Inventeurs/Déposants (US seulement): BUBLOT, Michel
[FR/FR]; 18 bis, rue Sartoretti, F-69290 Saint Genis les
Olières (FR). LAPLACE, Eliane [FR/FR]; 4, boulevard du
Général de Gaulle, F-69600 Oullins (FR). AUDONNET,
Jean-Christophe [FR/FR]; 119, rue de Créqui, F-69006
Lyon (FR).(74) Mandataires: COLOMBET, Alain etc.; Cabinet Lavoix, 2,
place d'Estienne d'Orves, F-75441 Paris Cedex 09 (FR).(81) Etats désignés: AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY,
CA, CH, CN, CU, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, GB, GE, GH,
HU, ID, IL, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS,
LT, LU, LV, MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL,
PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT,
UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZW, brevet ARIPO (GH, GM,
KE, LS, MW, SD, SZ, UG, ZW), brevet eurasién (AM, AZ,
BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), brevet européen (AT, BE,
CH, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL,
PT, SE), brevet OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN,
ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Publiée

Avec rapport de recherche internationale.

Avant l'expiration du délai prévu pour la modification des
revendications, sera republiée si de telles modifications sont
reçues.(54) Title: LIVE RECOMBINANT AVIAN VACCINE USING THE AVIAN INFECTIOUS LARYNGOTRACHEITIS VIRUS AS
VECTOR(54) Titre: VACCIN VIVANT RECOMBINANT AVIAIRE, UTILISANT COMME VECTEUR LE VIRUS DE LA LARYNGOTRA-
CHEITE INFECTIEUSE AVIAIRE

Partie séquencée (7082 pb)

(57) Abstract

The live recombinant avian vaccine comprises, as vector, an ILTV containing and expressing at least a heterologous nucleotide sequence, said nucleotide sequence being inserted in the insertion locus formed by the internal ribosome entry site (IRES) located between the stop codons of COL D and COL E of ILTV and which, in a particular ILTV strain is defined between nucleotides 3873 and 4260 at SEQ ID NO:1. The heterologous nucleotide sequence can be under the control of a strong eukaryotic promoter, such as CMV-IE promoter, and can be derived from viruses of Newcastle disease, Marek disease, Gumboro disease, infectious bronchitis, chicken anaemia, chicken pneumovirus. The invention also concerns a multivalent vaccine comprising at least two live vaccines as per the invention and the recombined ILTV virus.

BEST AVAILABLE COPY

(57) Abrégé

Le vaccin vivant recombinant aviaire comprend comme vecteur, un virus ILTV comprenant et exprimant au moins une séquence nucléotidique hétérologue, cette séquence nucléotidique étant insérée dans le locus d'insertion formé par l'intergène situé entre les codons stop des COL D et COL E d'ILTV et qui, dans une souche d'ILTV particulière, est défini entre les nucléotides 3873 et 4260 à la SEQ ID NO: 1. La séquence nucléotidique hétérologue peut être sous le contrôle d'un promoteur eucaryote fort, tel que promoteur CMV-IE, et peut provenir des virus de la maladie de Newcastle, de la maladie de Marek, de la maladie de Gumboro, de la bronchite infectieuse, de l'anémie du poulet, de la pneumovirose du poulet. Formule de vaccin multivalent comprenant au moins deux vaccins vivants selon l'invention. Virus ILTV ainsi recombiné.

UNIQUEMENT A TITRE D'INFORMATION

Codes utilisés pour identifier les Etats parties au PCT, sur les pages de couverture des brochures publiant des demandes internationales en vertu du PCT.

AL	Albanie	ES	Espagne	LS	Lesotho	SI	Slovénie
AM	Arménie	FI	Finlande	LT	Lituanie	SK	Slovaquie
AT	Autriche	FR	France	LU	Luxembourg	SN	Sénégal
AU	Australie	GA	Gabon	LV	Lettonie	SZ	Swaziland
AZ	Azerbaïdjan	GB	Royaume-Uni	MC	Monaco	TD	Tchad
BA	Bosnie-Herzégovine	GE	Géorgie	MD	République de Moldova	TG	Togo
BB	Barbade	GH	Ghana	MG	Madagascar	TJ	Tadjikistan
BE	Belgique	GN	Guinée	MK	Ex-République yougoslave de Macédoine	TM	Turkménistan
BF	Burkina Faso	GR	Grèce	ML	Mali	TR	Turquie
BG	Bulgarie	HU	Hongrie	MN	Mongolie	TT	Trinité-et-Tobago
BJ	Bénin	IE	Irlande	MR	Mauritanie	UA	Ukraine
BR	Bésil	IL	Israël	MW	Malawi	UG	Ouganda
BY	Bélarus	IS	Islande	MX	Mexique	US	Etats-Unis d'Amérique
CA	Canada	IT	Italie	NE	Niger	UZ	Ouzbékistan
CF	République centrafricaine	JP	Japon	NI	Ni	VN	Viet Nam
CG	Congo	KE	Kenya	NO	Norvège	YU	Yougoslavie
CH	Suisse	KG	Kirghizistan	NZ	Nouvelle-Zélande	ZW	Zimbabwe
CI	Côte d'Ivoire	KP	République populaire démocratique de Corée	PL	Pologne		
CM	Cameroun	KR	République de Corée	PT	Portugal		
CN	Chine	KZ	Kazakhstan	RO	Roumanie		
CU	Cuba	LC	Sainte-Lucie	RU	Fédération de Russie		
CZ	République tchèque	LI	Liechtenstein	SD	Soudan		
DE	Allemagne	LK	Sri Lanka	SE	Suède		
DK	Danemark	LR	Libéria	SG	Singapour		
EE	Estonie						

Vaccin vivant recombinant aviaire, utilisant comme vecteur le virus de la laryngotrachéite infectieuse aviaire.

La présente invention a trait à des vaccins à usage aviaire à base de virus de la laryngotrachéite infectieuse (ILTV), dans lequel a été insérée, par recombinaison génétique, au moins une séquence nucléotidique hétérologue, notamment codant pour, et exprimant, un polypeptide antigénique d'un agent pathogène aviaire, dans des conditions assurant une immunisation conduisant à une protection efficace de l'animal vacciné contre ledit agent pathogène.

Le virus de la laryngotrachéite infectieuse (ILTV) est un alphaherpèsvirus (B. Roizman, *Arch. Virol.* 1992. 123. 425-449) qui provoque une pathologie respiratoire importante (la laryngotrachéite infectieuse ou ILT) chez le poulet (L.E. Hanson et T.J. Bagust, *Diseases of Poultry* 9th edn 1991.pp 485-495. Ames, Iowa State University Press). Les vaccins actuellement disponibles contre cette affection contiennent une souche atténuée administrable par différentes voies dont les voies intranasales, conjonctivales,

cloacales, dans l'eau de boisson et par aérosol (L.E. Hanson et T.J. Bagust, *Diseases of Poultry* 9th Edition 1991.pp 485-495. Ames, Iowa State University Press).

Les études de biologie moléculaire du virus ILTV ont permis de caractériser le génome viral (M.A. Johnson *et al.*, *Arch. Virol.* 1991. 119. 181-198) et d'identifier
5 quelques gènes du virus (A.M. Griffin, *J. Gen. Virol.* 1989. 70. 3085-3089) dont les gènes codant pour la thymidine kinase (UL23) (A.M. Griffin et M.E.G. Bournsnel, *J. Gen. Virol.* 1990. 71. 841-850; C.L. Keeler *et al.*, *Avian Dis.* 1991. 35. 920-929), la glycoprotéine gB (UL27) (A.M. Griffin, *J. Gen. Virol.* 1991. 72. 393-398; K. Kongsuwan *et al.*, *Virology* 1991. 184. 404-410; D.J. Poulsen *et al.*, *Virus Genes* 1991.
10 5. 335-347), la glycoprotéine gC (UL44) (D.H. Kingsley *et al.*, *Virology* 1994. 203. 336-343), la protéine de capsid p40 (UL26) (A.M. Griffin, *Nucl. Acids Res.* 1990. 18. 3664), la protéine homologue de la protéine ICP4 de l'herpès simplex (HSV-1) (M.A. Johnson *et al.*, *Virus Research* 1995. 35. 193-204), les protéines homologues aux protéines ICP27 (UL54), glycoprotéine gK (UL53) et DNA hélicase (UL52) de l'HSV-1
15 (M.A. Johnson *et al.*, *Arch. Virol.* 1995. 140. 623-634), la ribonucléotide réductase (A.M. Griffin, *J. Gen. Virol.* 1989. 70. 3085-3089, WO-A-90/02802), les gènes UL1 à UL5 (W. Fuchs et T.C. Mettenteleiter, *J. Gen. Virol.* 1996. 77. 2221-2229), les gènes présents dans la séquence unique courte du génome (U_s) (M.A. Johnson *et al.*, *DNA Séquence- The Journal of Sequencing and Mapping* 1995. Vol. 5. pp191-194; K.
20 Kongsuwan *et al.*, *Arch. Virol.* 1995. 140. 27-39; K. Kongsuwan *et al.*, *Virus Research* 1993. 29. 125-140; K. Kongsuwan *et al.*, *Virus Gene* 1993. 7. 297-303; M.A. Wild *et al.*, *Virus Genes* 1996. 12. 107-116; WO-A-92/03554; WO-A-95/08622).

La présente invention a pour objectif de mettre au point un vaccin aviaire à base de virus ILTV recombinant exprimant un gène hétérologue, ce virus étant capable de se
25 répliquer et d'induire une immunité chez l'hôte vacciné tout en conservant une bonne innocuité.

Un autre objectif de l'invention est de proposer un tel vaccin qui soit en même temps particulièrement efficace contre la laryngotrachéite infectieuse (ILT).

Un autre objectif de l'invention est de proposer un tel vaccin qui soit utilisable
30 dans la vaccination de masse par voie mucosale, par exemple par voie aérosol ou dans l'eau de boisson, de telle manière que la réplication du virus au niveau mucosal permette

d'induire une immunité mucosale et systémique. Une telle immunité mucosale sera particulièrement efficace pour lutter contre les maladies respiratoires, ainsi que contre les autres maladies pour lesquelles la porte d'entrée de l'agent pathogène est mucosale.

5 Un autre objectif de l'invention est de proposer un tel vaccin qui soit utilisable aussi bien chez les adultes que chez les jeunes animaux.

Un objectif spécifique est de proposer un tel vaccin utilisable dans la vaccination de masse par voie mucosale des tout jeunes animaux tels que les poussins d'un jour.

10 Un autre objectif de l'invention est de proposer un vaccin contre l'ILT qui ait une efficacité accrue par rapport à la souche parentale et qui puisse même éventuellement permettre l'insertion et l'expression d'un gène hétérologue.

Au cours de leurs travaux sur le virus ILTV, les inventeurs ont trouvé une région génomique qui s'est révélée tout à fait appropriée comme site d'insertion de gènes hétérologues. Cela a permis de mettre au point un vaccin vivant recombinant à base d'un vecteur ILTV dans lequel est insérée au moins une séquence codant pour un immunogène aviaire, en particulier les protéines HN et F du virus de la maladie de Newcastle (NDV), et/ou la glycoprotéine gB du virus de la maladie de Marek (MDV), et/ou la protéine VP2 du virus de la maladie de Gumboro (IBDV), et/ou les protéines S et M du virus de la bronchite infectieuse (IBV). Un tel vaccin incorporant une séquence codant pour des protéines du NDV, du MDV et/ou de l'IBV assure une protection satisfaisante des animaux contre la maladie de Newcastle, contre la maladie de Marek, contre la maladie de Gumboro, et contre la bronchite infectieuse respectivement.

25 La présente invention a donc pour objet un vaccin vivant recombinant aviaire comprenant, comme vecteur, le virus ILTV comprenant au moins une séquence nucléotidique hétérologue, notamment codant pour, et exprimant, un polypeptide antigénique d'un agent pathogène aviaire, insérée dans le locus d'insertion formé de l'intergène situé entre les codons "stop" des COL-D et COL-E du virus ILTV et qui, dans une souche ILTV particulière, est défini entre les nucléotides 3873 et 4260 à la séquence SEQ ID NO:1.

Si la séquence particulière décrite dans la demande (SEQ ID NO:1) provient de la souche vaccinale d'ILTV T-20 12-8-66 (vaccin LT BLEN) provenant de Select Laboratories (10026 Main Street P.O. Box 6 Berlin, Maryland 21811, USA), il est bien évident que l'homme du métier pourra utiliser les autres souches d'ILTV, compte-tenu
5 des informations données dans la présente sur la souche vaccinale.

Le COL-E correspond au gène UL54 décrit dans l'article de M.A. Johnson *et al.* (Arch. Virol. 1995. 140. 623-634) de la souche vaccinale australienne SA-2. La séquence nucléotidique du gène UL54 de la souche SA-2 est légèrement différente de celle de la souche T-20, ce qui entraîne des différences entre les séquences en acides aminés des
10 gènes de ces 2 souches, et notamment à la partie C-terminale (codons STOP différents). Cet article ne suggère en aucune manière que la séquence en aval du gène UL54 puisse être utilisée comme locus d'insertion.

La séquence référencée SEQ ID NO:19 reproduit pour cette souche SA-2, une partie de la séquence équivalente à SEQ ID NO:1 (en sens inverse). L'intergène servant
15 de locus d'insertion conformément à l'invention est en partie compris à la SEQ ID NO:19 entre les nucléotides 2808 et 3116 (dernier nucléotide de cette séquence).

Par séquence hétérologue, on entend une séquence qui ne provient pas de ce locus d'insertion, c'est-à-dire aussi bien une séquence n'ayant pas pour origine le virus ILTV, qu'une séquence provenant d'une autre région génomique de ce virus, ou encore
20 provenant d'une autre souche ILTV, notamment une souche virulente.

Par insertion dans la région d'insertion, on entend notamment insertion simple ou après délétion totale ou partielle du locus d'insertion.

On peut insérer une ou plusieurs cassettes d'expression chacune comprenant au moins une séquence à exprimer.

25 Pour exprimer la séquence insérée, on préfère utiliser un promoteur eucaryote fort tel que le promoteur CMV immediate early (IE), le LTR du virus du sarcome de Rous (RSV), et le promoteur précoce du virus SV40.

Par promoteur CMV immediate early (IE), on entend notamment le fragment donné dans les exemples ainsi que ses sous-fragments conservant la même activité
30 promotrice.

Le promoteur CMV IE peut être le promoteur humain (HCMV IE) ou le

promoteur murin (MCMV IE), ou encore un promoteur CMV IE d'une autre origine, par exemple du singe, du rat, du cobaye ou du porc.

D'autres promoteurs d'origine virale ou cellulaire peuvent également être utilisés. Parmi les promoteurs d'origine virale, on peut encore citer les promoteurs de gènes du virus ILTV (gènes considérés comme précoce-immédiats (ICP4, ICP27, ...), précoces (thymidine kinase, DNA helicase, ribonucléotide réductase, ...), ou tardifs (gB, gD, gC, gK, ...)), du virus de la maladie de Marek (MDV) (gènes gB, gC, pp38, pp14, ICP4, Meq,...) ou du virus de l'herpès de la dinde (herpèsvirus of turkey) (gènes gB, gC, ICP4, ...).

10 La séquence nucléotidique insérée dans le vecteur ILTV pour être exprimée peut être toute séquence codant pour un polypeptide antigénique, d'un agent pathogène aviaire, capable, une fois exprimé dans les conditions favorables procurées par l'invention, d'assurer une immunisation conduisant à une protection efficace de l'animal vacciné contre l'agent pathogène. On pourra donc insérer, dans les conditions de
15 l'invention, les séquences nucléotidiques codant pour les antigènes d'intérêt pour une maladie donnée.

Cette séquence nucléotidique insérée dans le vecteur ILTV peut également coder pour un polypeptide immunomodulateur, et notamment une cytokine.

De manière remarquable, les vaccins selon l'invention pourront être utilisés pour
20 la vaccination *in ovo*, des poussins d'un jour ou plus et des adultes. Différentes voies d'administration pourront être utilisées: la voie parentérale, ou les voies mucosales telles que oronasale (eau de boisson, aérosol), conjonctivale (goutte dans l'oeil) ou cloacale, avec une préférence pour les voies permettant une vaccination mucoale de masse (eau de boisson, aérosol).

25 L'invention se révèle particulièrement utile aussi bien pour la protection contre les pathologies respiratoires que contre les pathologies systémiques en bloquant les voies d'entrée naturelles de l'agent pathogène.

L'invention peut notamment être utilisée pour l'insertion d'une séquence nucléotidique codant convenablement pour une protéine antigénique du virus NDV et en
30 particulier, la glycoprotéine HN ou la glycoprotéine F. On obtient ainsi un vaccin vivant recombinant assurant, en plus d'une protection contre la laryngotrachéite infectieuse, une

protection satisfaisante contre la maladie de Newcastle.

Le vaccin recombinant contre la maladie de Newcastle contiendra de préférence de 10^4 PFU/dose.

D'autres cas préférés de l'invention sont l'insertion de séquences nucléotidiques codant pour des antigènes d'autres agents pathogènes aviaires, et notamment, mais de manière non limitative, des antigènes du virus de la maladie de Marek, en particulier gènes gB, gC, gD, et gH+gL (WO-A-90/02803), du virus de la maladie de Gumboro, en particulier gène VP2, du virus de la bronchite infectieuse (IBV), en particulier gènes S et M (M. Binns *et al.*, *J. Gen. Virol.* 1985. 66. 719-726 ; M. Boursnell *et al.*, *Virus Research* 1984. 1. 303-313), du virus de l'anémie du poulet (CAV), en particulier VP1 (52 kDa) + VP2 (24 kDa) (N.H.M. Noteborn *et al.*, *J. Virol.* 1991. 65. 3131-3139), du virus ILTV, en particulier les gènes codant pour gB (A.M. Griffin, *J. Gen. Virol.* 1991. 72. 393-398), ou pour gD (M.A. Johnson *et al.*, *DNA Sequence-The Journal of Sequencing and Mapping* 1995. Vol. 5. pp191-194. Harwood Academic Publishers GmbH), ou pour gp60 (K.K. Kongsuwan *et al.*, *Virus Genes* 1993. 7. 297-303), et du virus du syndrome infectieux du gonflement de la tête ("swollen head syndrome" ou pneumovirose du poulet ou turkey rhinotracheitis virus (TRTV) de la dinde; pneumovirus), en particulier la glycoprotéine de fusion F (Q. Yu *et al.*, *J. Gen. Virol.* 1991. 72. 75-81), ou la glycoprotéine d'attachement G (R. Ling *et al.*, *J. Gen. Virol.* 1992. 73. 1709-1715; K. Juhasz et J. Easton, *J. Gen. Virol.* 1994. 75. 2873-2880). Les doses seront de préférence les mêmes que celles pour le vaccin de Newcastle.

Dans le cadre de la présente invention, on peut bien entendu insérer plus d'une séquence hétérologue dans le même virus ILTV, notamment dans ce locus. On peut notamment y insérer des séquences provenant d'un même virus ou de virus différents, ce qui comprend également l'insertion de séquences d'ILTV et d'un autre virus aviaire. On peut également y associer des séquences codant pour des immunomodulateurs, et en particulier des cytokines.

Par exemple, on associe au promoteur CMV IE un autre promoteur de façon que leurs extrémités 5' soient adjacentes (ce qui implique des transcriptions dans des sens opposés), ce qui permet d'insérer, dans la zone d'insertion, deux séquences nucléotidiques, l'une sous la dépendance du promoteur CMV IE, l'autre sous celle du

promoteur associé. Cette construction est remarquable par le fait que la présence du promoteur CMV IE, et notamment de sa partie activatrice (enhancer), active la transcription induite par le promoteur associé. Le promoteur associé peut être en particulier un promoteur d'un gène du virus ILTV ou du virus MDV ou HVT.

5 Un cas intéressant de l'invention est un vaccin comprenant une séquence nucléotidique codant pour HN de NDV et une séquence nucléotidique codant pour F de NDV ou un antigène d'une autre maladie aviaire, notamment celles citées plus haut, l'un des gènes étant sous le contrôle du promoteur CMV IE, et l'autre sous le contrôle du promoteur associé.

10 On peut aussi monter deux promoteurs CMV IE d'origines différentes avec leurs extrémités 5' adjacentes.

L'expression de plusieurs gènes hétérologues insérés dans le locus d'insertion peut également être rendu possible par insertion entre les cadres ouverts de lecture de ces gènes d'une séquence appelée "IRES" (Internal Ribosome Entry Site) provenant
15 notamment d'un picornavirus tel le virus de la maladie vésiculaire du porc (swine vesicular disease virus, SVDV; B.-F. Chen *et al.*, *J. Virology*, 1993, 67, 2142-2148), le virus de l'encéphalomyocardite (EMCV; R.J. Kaufman *et al.*, *Nucleic Acids Research*, 1991, 19, 4485-4490), le virus de la fièvre aphteuse (FMDV; N. Luz et E. Beck, *J. Virology*, 1991, 65, 6486-6494), ou encore d'une autre origine. Le contenu des 3 articles
20 cités est incorporé par référence. La cassette d'expression de deux gènes aurait donc la structure minimale suivante: promoteur - gène 1 - IRES - gène2 - signal de polyadénylation. Le vaccin vivant recombinant selon l'invention pourra donc comprendre, insérée dans le locus d'insertion, une cassette d'expression comprenant successivement un promoteur, deux ou plusieurs gènes séparés deux à deux par un IRES,
25 et un signal de polyadénylation.

En plus de l'insertion dans le locus selon l'invention, on peut réaliser une ou plusieurs autres insertions, une ou plusieurs mutations, ou une ou plusieurs délétions ailleurs dans le génome; si la souche parentale est virulente, on peut par exemple
30 inactiver (par délétion, insertion ou mutation) des gènes impliqués dans la virulence tels que le gène thymidine kinase, le gène ribonucléotide réductase, le gène gE,... Dans tous les cas, l'insertion dans un autre locus que celui décrit dans l'invention, permet

d'exprimer d'autres gènes.

La présente invention a aussi pour objet un vaccin contre l'ILT comprenant un virus ILTV recombinant dans lequel on a inséré en amont des gènes codant pour des immunogènes majeurs de l'ILTV, de préférence les gènes codant pour gB (A.M. Griffin, *J. Gen. Virol.* 1991. 72. 393-398), ou pour gD (M.A. Johnson *et al.*, *DNA Sequence-The Journal of Sequencing and Mapping* 1995. Vol. 5. pp191-194. Harwood Academic Publishers GmbH), ou pour gp60 (K.K. Kongsuwan *et al.*, *Virus Genes* 1993. 7. 297-303), un promoteur exogène, en particulier un promoteur fort tel que décrit plus haut. Cela permet d'augmenter le niveau d'expression de l'un ou plusieurs de ces gènes et ainsi conduire à un vaccin à efficacité accrue contre l'ILT. On peut bien sûr combiner cela avec une construction telle que décrite plus haut comprenant l'insertion d'une séquence hétérologue dans le locus d'insertion.

La présente invention a aussi pour objet une formule de vaccin multivalent, comprenant, en mélange ou à mélanger, un vaccin tel que défini plus haut avec un autre vaccin, et notamment un autre vaccin vivant recombinant aviaire tel que défini plus haut, ces vaccins comprenant des séquences insérées différentes, notamment de pathogènes différents.

La présente invention a aussi pour objet une méthode de préparation des vaccins selon l'invention, telle qu'elle ressort de la description.

La présente invention a aussi pour objet une méthode de vaccination aviaire comprenant l'administration d'un vaccin vivant recombinant ou d'une formule de vaccin multivalent tel que défini plus haut. Elle a notamment pour objet une telle méthode pour la vaccination *in ovo*, des poussins d'un jour ou plus et des adultes. Différentes voies d'administration du vaccin peuvent être utilisées (voir plus haut) avec une préférence pour les voies permettant une vaccination de masse par voie mucosale (aérosol, eau de boisson), la dose de vaccin étant choisie de préférence entre 10^1 et 10^4 par animal.

La présente invention a aussi pour objet un virus ILTV comprenant au moins une séquence nucléotidique hétérologue telle que décrite ci-dessus insérée dans le locus d'insertion tel que défini plus haut.

La présente invention a encore pour objet tout ou partie de la séquence SEQ ID NO:1. Par partie de la séquence, on entend non seulement les COLs caractérisés pris

séparément et leurs fragments, mais aussi la région intergénique située entre les COLs D et E, et les fragments situés de chaque côté de cette région intergénique, qui peuvent, le cas échéant inclure une partie de cette région intergénique, ces fragments pouvant servir de bras flanquant pour une recombinaison homologue, technique parfaitement connue de l'homme du métier. De manière générale, mais sans que cela soit limitatif, les bras flanquants pourront avoir de 100 à 1500 paires de bases.

L'invention va être maintenant décrite plus en détail à l'aide d'exemples de réalisation non limitatifs, pris en référence au dessin, dans lequel :

- Figure 1 : Carte de restriction du fragment cloné et position des COLs
- 10 Figure 2 : Séquence de 7082 pb et traduction des COLs A, B, C, D, E et F de la souche vaccinale T-20 de Select Laboratories
- Figure 3 : Schéma d'obtention du plasmide pEL168
- Figure 4 : Schéma d'obtention du plasmide pEL024
- Figure 5 : Schéma d'obtention du plasmide pEL027
- 15 Figure 6 : Schéma du plasmide pEL169
- Figure 7 : Schéma d'obtention du plasmide pCD009
- Figure 8 : Schéma d'obtention du plasmide pEL070
- Figure 9 : Schéma du plasmide pEL170
- Figure 10 : séquence du gène HN du NDV
- 20 Figure 11 : Schéma d'obtention du plasmide pEL030
- Figure 12 : Schéma du plasmide pEL171
- Figure 13 : Schéma du plasmide pEL033
- Figure 14 : Schéma du plasmide pEL172
- Figure 15 : Schéma de double cassette d'expression
- 25 Figure 16 : Schéma d'obtention du plasmide pCD011
- Figure 17 : Schéma du plasmide pEL181
- Figure 18 : Séquence de 3116 pb et traduction des UL53 et 54 de la souche SA-2

Liste des séquences :

	SEQ ID NO:1	Séquence du fragment <i>EcoRI-EcoRI</i> (7082 pb, voir figure 2)
	SEQ ID NO:2	Oligonucléotide EL005
	SEQ ID NO:3	Oligonucléotide EL006
5	SEQ ID NO:4	Oligonucléotide EL007
	SEQ ID NO:5	Oligonucléotide EL008
	SEQ ID NO:6	Oligonucléotide MB070
	SEQ ID NO:7	Oligonucléotide MB071
	SEQ ID NO:8	Séquence du gène HN du NDV (voir figure 10)
10	SEQ ID NO:9	Oligonucléotide EL071
	SEQ ID NO:10	Oligonucléotide EL073
	SEQ ID NO:11	Oligonucléotide EL074
	SEQ ID NO:12	Oligonucléotide EL075
	SEQ ID NO:13	Oligonucléotide EL076
15	SEQ ID NO:14	Oligonucléotide EL077
	SEQ ID NO:15	Oligonucléotide CD001
	SEQ ID NO:16	Oligonucléotide CD002
	SEQ ID NO:17	Oligonucléotide CD003
	SEQ ID NO:18	Oligonucléotide CD004
20	SEQ ID NO:19	Séquence de la souche SA-2 (3116 bp, à partir du site <i>EcoRI</i> en position 1696 de la séquence de Genbank n° d'accès L34065 ; voir figure 18)

EXEMPLES

25 Toutes les constructions de plasmides ont été réalisées en utilisant les techniques standards de biologie moléculaire décrites par Sambrook J. *et al.* (*Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2nd Edition. Cold Spring Harbor Laboratory. Cold Spring Harbor, New York, 1989). Tous les fragments de restriction utilisés pour la présente invention ont été isolés en utilisant le kit "GeneClean" (BIO101 Inc. La Jolla, CA).

Le virus utilisé comme virus parental peut être choisi parmi les souches vaccinales décrites dans J.R. Andreasen *et al.* (*Avian Diseases* 1990. 34. 646-656) ou la souche T-20 12-8-66 vaccin LT BLEN provenant de Select laboratories 10026 Main Street P.O. Box 6 Berlin, Maryland 21811, USA. On peut également utiliser des souches virulentes
5 telles que la souche de Lütticken (voir ci-dessus), la souche N-71851 (ATCC VR-783) ou la souche 83-2 de l'USDA, que l'on peut atténuer par les techniques connues, par exemple celle décrite dans WO-A-95/08622.

Exemple 1: Culture du virus ILTV:

Le virus ILTV (souche T20 de Select Laboratories) est cultivé sur des cellules primaires de reins de poulets (CRP); ces cellules sont mises en culture en milieu MEM complé-
5 cm² (2 10⁵ cellules/cm²) un ou deux jours avant inoculation.

Le jour de l'inoculation, un flacon de 1000 doses de vaccin lyophilisé est resuspendu dans 10 ml de milieu MEM complé-
10 menté avec 1% de SVF; environ 0,5 ml de cette solution est ensuite déposé sur la culture de CRP. Le lendemain, le milieu est changé, et le surlendemain, lorsque l'effet cytopathogène (ECP) se généralise, les flacons de culture sont congelés à -70°C.

La culture du virus ILTV peut également être faite sur des cellules immortalisées de foie de poulet, et notamment sur la lignée LMH (W.M. Schnitzlein *et al.*, *Avian Diseases* 1994. 38. 211-217).

Exemple 2: Préparation de l'ADN génomique de l'ILTV:

15 Après 2 cycles de congélation/décongélation, la culture d'ILTV (2 flacons de 75 cm²) est récoltée et centrifugée à basse vitesse (5000 tr/min dans un rotor 20, centrifugeuse Beckman JA21, pendant 5 minutes) pour éliminer les gros débris cellulaires. Le
sur-
nageant est ensuite ultracentrifugé (100000 tr/min rotor TLA100.3, centrifugeuse Beckman TL100, pendant 1 heure). Le culot est alors repris dans 1,6 ml de TEN-SDS
20 (Tris pH 8,0 10mM; EDTA 1mM; NaCl 0,5M; sodium dodecyl sulfate 0,5%), et 35 µl d'une solution de protéinase K à 20 mg/ml sont ensuite ajoutés; la solution est incubée 3 à 4 heures au bain marie à 37°C, et l'ADN est ensuite extrait 3 fois au
phénol/chloroforme et 1 fois au chloroforme, puis il est précipité à l'éthanol à -20°C. Après centrifugation, le culot est rincé à l'éthanol 70%, séché et resuspendu dans 200
25 µl TE (Tris pH8.0 10mM; EDTA 1mM). La concentration en acide nucléique est ensuite dosée au spectrophotomètre (DO₂₆₀). L'ADN peut être directement digéré par les enzymes de restriction appropriées, pour être ensuite cloné dans le plasmide pBlue Script II SK⁺; de même, il pourra également être utilisé dans les expériences de transfection pour l'obtention d'un virus recombinant.

Exemple 3: Isolement et purification de virus recombinant ILTV

Le plasmide donneur composé d'une cassette d'expression d'un polypeptide inséré entre deux régions flanquantes du locus d'insertion est digéré par une enzyme de restriction permettant la linéarisation du plasmide, puis il est extrait avec un mélange

5 phénol/chloroforme, précipité avec de l'éthanol absolu, et repris dans de l'eau stérile. Des cellules CRP primaires de 24 heures sont ensuite transfectées avec le mélange suivant: 0,2 à 1 μg de plasmide donneur linéarisé + 2 à 5 μg d'ADN viral d'ILTV (préparé comme dans l'exemple 2) dans 300 μl de milieu OptiMEM (Gibco BRL Cat# 041-01985H) et 100 μg de LipofectAMINE dilués dans 300 μl de milieu (volume final

10 du mélange = 600 μl). Ces 600 μl sont ensuite dilués dans 3 ml (volume final) de milieu et étalés sur $5 \cdot 10^5$ CRP. Le mélange est laissé en contact avec les cellules pendant 5

heures, puis éliminé et remplacé par 5 ml de milieu de culture. Les cellules sont alors laissées en culture pendant 3 à 8 jours à + 37°C, puis, lorsque l'effet cytopathogène est

15 apparu, elles sont congelées à -70°C. Après décongelation et éventuellement sonication, cette population virale est clonée en dilution limite en microplaques (96 puits) afin d'isoler une population homogène de virus recombinant. Ces plaques sont laissées en culture pendant 1 à 3 jours, puis le surnageant est récolté dans une plaque 96 puits vide

et la plaque contenant les surnageants est placée à 4°C ou à -70°C. Les cellules restant dans les autres plaques sont ensuite fixées à l'acétone 95% pendant 20 à 30 minutes à -

20 20°C, ou pendant 5 minutes à température ambiante. Une réaction d'immunofluorescence indirecte (IFI) est réalisée avec un anticorps monoclonal dirigé contre le polypeptide exprimé pour rechercher les plages exprimant ce polypeptide. Un

nouveau clonage est ensuite effectué de la même manière (en dilution limite en plaques 96 puits) à partir du surnageant présent dans les cupules des plaques mises à 4°C ou à

25 -70°C et correspondant aux cupules présentant des plages positives en IFI. En général, 4 cycles d'isolement successifs (dilution limite, récolte du surnageant, contrôle des cellules par IFI, dilution limite à partir du surnageant...) suffisent pour obtenir des virus

recombinants dont la totalité de la progénie présente une fluorescence spécifique. L'ADN génomique de ces virus recombinants est caractérisé au niveau moléculaire par des

30 techniques classiques de PCR et de Southern blot en utilisant les oligonucléotides et les sondes d'ADN appropriés.

L'isolement de virus recombinant peut également se faire par hybridation avec une sonde spécifique de la cassette d'expression insérée. Pour cela, la population virale récoltée après transfection est diluée et déposée sur des cellules CRP (cultivées en boîte de Petri) de manière à obtenir des plages isolées. Après un contact d'1 heure à 37°C, le milieu d'infection est éliminé et remplacé par 5 ml de milieu MEM à 1 % d'agarose, maintenu en surfusion à 42°C. Lorsque l'agarose est solidifié, les boîtes sont incubées 48 à 72 heures à 37°C en étuve CO₂ jusqu'à apparition de plages. La couche d'agarose est alors éliminée et un transfert des plages virales est réalisé sur une membrane stérile de nitrocellulose de même diamètre que la boîte de Petri ayant servi à la culture. Cette membrane est elle-même transférée sur une autre membrane de nitrocellulose de manière à obtenir une "copie" inversée du premier transfert. Les plages transférées sur cette dernière copie sont alors hybridées, selon les techniques usuelles connues de l'homme de l'art, avec un fragment d'ADN de la cassette d'expression marqué à la digoxigénine (DNA Labelling Kit, Boehringer Mannheim, CAT # 1175033). Après hybridation, lavages et mise en contact avec le substrat de révélation, la membrane de nitrocellulose est mise en contact avec un film autoradiographique. Les images d'hybridation positive sur cette membrane indiquent quelles sont les plages qui contiennent des virus ILTV recombinants ayant inséré la cassette d'expression. Les plages correspondant à ces plages positives sont découpées stérilement sur la première membrane de nitrocellulose, placées dans un tube Eppendorf contenant 0,5 ml de milieu MEM et soniquées pour libérer les virions de la membrane. Le milieu contenu dans le tube Eppendorf est ensuite dilué en milieu MEM et les dilutions ainsi obtenues servent à infecter de nouvelles cultures de cellules CRP.

Exemple 4: Clonage et caractérisation d'une région génomique de l'ILTV

L'ADN extrait du virus ILTV a été digéré par l'enzyme de restriction *EcoRI* pendant 2 heures à 37°C. L'enzyme de restriction a ensuite été éliminée par une extraction au phénol/chloroforme, suivie d'une précipitation à l'éthanol. Les fragments résultant de cette digestion ont ensuite été ligaturés (une nuit à 14°C) avec le plasmide pBlueScriptII SK+ (pBS SK+; Stratagene) digéré par *EcoRI* et traité à la phosphatase alcaline ;

l'analyse des clones obtenus après transformation de bactéries *E. coli* DH5 α et culture sur boîtes de milieu complétement en ampiciline a permis d'identifier des inserts *Eco*RI-*Eco*RI de tailles différentes, dont un fragment d'environ 7 kb (plasmide pEL133).

Le séquençage complet de l'insert présent dans pEL133 (voir figure 1) a permis de
5 mettre en évidence cinq cadres ouverts de lecture (COLs) complets d'au moins 120 acides aminés (COLs A, B, C, D et E), et une partie d'un autre COL (COL F). La carte de restriction de cette région génomique clonée et séquencée, est montrée à la figure 1;

~~la séquence de 7082 pb (SEQ ID NO:1) est montrée à la figure 2. La position et la~~

séquence en acides aminés des COLs A, B, C, D, E et F sont également montrées sur
10 les figures 1 et 2 respectivement.

La séquence entre les codons STOP des COLs D et E (position de 3873 à 4260 sur SEQ ID NO:1), est utilisable pour insérer des cassettes d'expression de polypeptides dans le génome de l'ILTV. Cette séquence est appelée locus d'insertion. L'insertion peut se faire avec ou sans délétion dans la région intergénique (voir exemple 5).

15 **Exemple 5: Construction du plasmide donneur pEL168 pour l'insertion dans la région intergénique entre les COLs D et E**

Le plasmide pBluescript II SK+ (pPB SK+ ; Stratagene) a été digéré par les enzymes *Xho*I et *Hind*III, et ensuite traité à l'ADN polymérase (fragment de Klenow) en présence de dNTP pour rendre les bouts francs. Après ligation et transformation des bactéries *E. coli*, le clone pEL166 (2957 pb) a été obtenu.

20 Le plasmide pEL166 a été digéré par les enzymes *Sca*II et *Xba*I, et ensuite traité à l'ADN polymérase (fragment de Klenow) en présence de dNTP pour rendre les bouts francs. Après ligation et transformation des bactéries *E. coli*, le clone pEL167 (2944 pb) a été obtenu.

25 Les oligonucléotides EL005 (SEQ ID No:2) et EL006 (SEQ ID No:3) ont servi d'amorce pour une première amplification en chaîne par la Taq polymérase (PCR). Les oligonucléotides EL007 (SEQ ID No:4) et EL008 (SEQ ID No:5) ont servi d'amorce

pour une deuxième amplification en chaîne par la Taq polymérase (PCR).

EL005 (SEQ ID No : 2) : 5' TGCCGGAGCGCAACCGCATGG 3'

EL006 (SEQ ID No : 3) : 5' GACACCGAATTCGTAAGCTTTCCCCGGGCAGTCG
ACAACGTGGAGCATTTTTATTTATC 3'

5 EL007 (SEQ ID No : 4) : 5' GTGTTATCTCTCTAGCATTGGC 3'

EL008 (SEQ ID No : 5) : 5' AGTTCTGAATTCGTGTCCGTTGTATTGTATTTC 3'

Les PCR ont été effectuées en présence de tampon PCR, de dNTP, d'ADN du plasmide pEL133, de Taq polymérase, et pour la première PCR, des oligonucléotides EL005 et EL006, et pour la deuxième PCR, des oligonucléotides EL007 et EL008.

10 Pour les deux PCR, 25 cycles ont été effectués (30 secondes à 94°C ; 30 secondes à 60°C et 30 secondes à 72°C). Les produits des deux PCR ont été purifiés par une extraction au phénol/chloroforme, suivie d'une purification par l'éthanol. Le produit de la première PCR (EL005/EL006) a ensuite été digéré par les enzymes de restriction *Bst*BI et *Eco*RI pendant 2 h à 37°C pour donner un fragment d'ADN *Bst*BI-*Eco*RI de 1132
15 pb qui a été élué après électrophorèse en gel d'agarose. Le produit de la deuxième PCR (EL007/EL008) a ensuite été digéré par les enzymes de restriction *Bgl*II et *Eco*RI pendant 2 h à 37°C pour donner un fragment d'ADN *Bgl*II-*Eco*RI de 550 pb qui a été élué après électrophorèse en gel d'agarose. Le plasmide pEL167 a été digéré par les enzymes *Cla*I et *Bam*HI. Les deux fragments de PCR *Bst*BI-*Eco*RI (1132 pb) et *Bgl*II-*Eco*RI (550 pb) ont été ligaturés une nuit à 14°C avec le plasmide pEL167 digéré par
20 *Cla*I et *Bam*HI. Après transformation des bactéries *E. coli*, et culture sur boîtes de milieu complémenté en ampicilline, le clone pEL168 (4589 pb), comprenant un polylinker *Eco*RI - *Hind*III - *Sma*I - *Sal*I a été obtenu (voir schéma d'obtention de pEL168 à la figure 3).

Exemple 6: Construction du plasmide donneur pEL169 pour l'insertion d'une cassette d'expression du gène VP2 de l'IBDV sous contrôle du promoteur HCMV IE dans le site intergénique entre les COLs D et E, et isolement de vILTV13:

6.1 - Clonage du gène VP2 du virus de la maladie de Gumboro (IBDV) et construction d'une cassette d'expression de VP2 sous contrôle du promoteur HCMV IE

Le plasmide pEL004 (voir figure 4; = plasmide pGH004 décrit dans la demande de brevet français 92.13109) contenant le gène IBDV VP2 sous forme d'une cassette *Bam*HI-*Hind*III a été digéré par *Bam*HI et *Xba*I pour isoler le fragment *Bam*HI-*Xba*I (gène VP2 tronqué) de 1104 pb. Ce fragment a été cloné dans le vecteur pBS SK+,

préalablement digéré avec *Xba*I et *Bam*HI pour donner le plasmide pEL022 de 4052 pb (figure 4). Le vecteur pBS-SK+ a été digéré par *Eco*RV et *Xba*I, puis ligaturé sur lui-même pour donner pBS-SK* (modifié). Le plasmide pEL004 a été digéré par *Kpn*I et *Hind*III pour isoler le fragment *Kpn*I-*Hind*III de 1387 pb contenant le gène IBDV VP2 complet. Ce fragment a été cloné dans le vecteur pBS-SK*, préalablement digéré par *Kpn*I et *Hind*III, pour donner le plasmide pEL023 de 4292 pb (figure 4). Le plasmide pEL022 a été digéré par *Bam*HI et *Not*I pour isoler le fragment *Bam*HI-*Not*I de 1122 pb (fragment A). Le plasmide pEL023 a été digéré par *Bam*HI et *Not*I pour isoler le fragment *Bam*HI-*Not*I de 333 pb (fragment B). Les fragments A et B ont été ligaturés ensemble avec le vecteur pBS-SK+, préalablement digéré par *Not*I et traité avec la phosphatase alcaline, pour donner le plasmide pEL024 de 4369 pb (figure 4).

Le plasmide pEL024 a été digéré par *Not*I pour isoler le fragment *Not*I-*Not*I de 1445 pb. Ce fragment a été ligaturé avec le plasmide pCMV β (Clontech Cat# 6177-1, figure 5), préalablement digéré par *Not*I, pour donner le plasmide pEL026 de 5095 pb (figure 5).

Le plasmide pEL026 a été digéré par *Eco*RI, *Sal*I et *Xmn*I pour isoler le fragment *Eco*RI-*Sal*I de 2428 pb. Ce fragment a été ligaturé avec le vecteur pBS-SK+, préalablement digéré par *Eco*RI et *Sal*I, pour donner le plasmide pEL027 de 5379 pb (figure 5).

6.2 - Construction du plasmide donneur pEL169

Le plasmide pEL027 a été digéré par *Eco*RI, *Sal*I et *Xmn*I pour isoler le fragment *Eco*RI-

Sall de 2428 pb. Ce fragment a été ligaturé dans le plasmide pEL168 (voir exemple 5 et figure 3), préalablement digéré par *EcoRI* et *Sall*, pour donner le plasmide pEL169 de 7007 pb (figure 6).

6.3 - Isolement et purification du virus recombinant vILTV13

- 5 Le virus vILTV13 a été isolé et purifié après cotransfection de l'ADN du plasmide pEL169 préalablement linéarisé par l'enzyme *KpnI* et de l'ADN viral, comme décrit dans l'exemple 3. Ce recombinant contient une cassette HCMV-IE/IBDV VP2 dans le site intergénique entre les COLs D et E du virus ILTV (voir exemple 5).

10 **Exemple 7: Construction du plasmide donneur pEL170 pour l'insertion d'une cassette d'expression du gène VP2 de l'IBDV sous contrôle du promoteur MCMV IE dans le site intergénique entre les COLs D et E et isolement de vILTV14:**

7.1 - Construction de pEL070 contenant une cassette d'expression du gène VP2 de l'IBDV sous contrôle du promoteur immediate early (IE) du MCMV (Mouse CytoMegalovirus)

- 15 Le plasmide pCMV β (Clontech Cat# 6177-1, figure 7) a été digéré par *Sall* et *SmaI* pour isoler le fragment *Sall-SmaI* de 3679 pb contenant le gène *lacZ* ainsi que le signal de poly-adénylation du gène tardif du virus SV40. Ce fragment a été inséré dans le vecteur pBS-SK+, préalablement digéré par *Sall* et *EcoRV*, pour donner le plasmide pCD002 de 6625 pb (figure 7). Ce plasmide contient le gène reporter *lacZ* mais aucun promoteur
- 20 n'est situé en amont de ce gène.

- Le virus MCMV souche Smith a été obtenu de l'American Type Culture Collection, Rockville, Maryland, USA (ATCC N° VR-194). Ce virus a été cultivé sur cellules d'embryon de souris Balb/C et l'ADN viral de ce virus a été préparé comme décrit par Ebeling A. et al. (J. Virol. 1983. 47. 421-433). Cet ADN génomique viral a été digéré
- 25 par *PstI* pour isoler le fragment *PstI-PstI* de 2285 pb. Ce fragment a été cloné dans le vecteur pBS-SK+, préalablement digéré par *PstI* et traité avec la phosphatase alcaline, pour donner le plasmide pCD004 (figure 7). Le plasmide pCD004 a été digéré par *HpaI*

et *Pst*I pour isoler le fragment *Hpa*I-*Pst*I de 1389 pb qui contient la région promotrice/activatrice du gène Immediate-Early du cytomégalovirus murin (Murine CytoMegaVirus = MCMV) (Dorsch-Häsler K. *et al.* Proc. Natl. Acad. Sci. 1985. 82. 8325-8329, et demande de brevet WO-A-87/03905). Ce fragment a été cloné dans le plasmide pCD002, préalablement digéré par *Pst*I et *Sma*I, pour donner le plasmide pCD009 de 8007 pb (figure 7).

Un oligonucléotide double brin a été obtenu par hybridation des deux oligonucléotides suivants :

MB070 (SEQ ID NO:6)

10 5' CGAATTCAGTGTGTGTCTGCAGGCGGCCGCGTGTGTGTCGACGGTAC
3'

MB071 (SEQ ID NO:7)

5' CGTCGACACACACGCGGCCGCCTGCAGACACACACTAGTGAATTCGAGCT
3'

15 Cet oligonucléotide double brin a été ligaturé avec le vecteur pBS-SK+, préalablement digéré par *Kpn*I et *Sac*I, pour donner le plasmide pEL067 (figure 8).

Le plasmide pCD009 a été digéré par *Pst*I et *Spe*I pour isoler le fragment *Pst*I-*Spe*I de 1396 pb. Ce fragment a été ligaturé avec le plasmide pEL067, préalablement digéré par *Pst*I et *Spe*I, pour donner le plasmide pEL068 de 4297 pb (figure 8). Le plasmide pEL024 (voir exemple 6, paragraphe 6.1 et figure 5) a été digéré par *Hind*III et *Not*I pour isoler le fragment *Hind*III-*Not*I de 1390 pb (fragment A). Le plasmide pEL027 (voir exemple 6, paragraphe 6.1 et figure 5) a été digéré par *Hind*III et *Sal*I pour isoler le fragment *Hind*III-*Sal*I de 235 pb (fragment B). Les fragments A et B ont été ligaturés ensemble avec le plasmide pEL068, préalablement digéré par *Not*I et *Sal*I, pour donner le plasmide pEL070 de 5908 pb (figure 8). Ce plasmide contient donc une cassette d'expression constituée du promoteur IE du MCMV, du gène VP2 et du signal polyA de SV40.

7.2 - Construction du plasmide donneur pEL170

Le plasmide pEL070 a été digéré par *Eco*RI, *Sal*I et *Xmn*I pour isoler le fragment *Eco*RI-*Sal*I de 3035 pb. Ce fragment a été ligaturé dans le plasmide pEL168 (voir exemple 5

et figure 3), préalablement digéré par *EcoRI* et *Sall*, pour donner le plasmide pEL170 de 7602 pb (figure 9). Ce plasmide permet l'insertion de la cassette d'expression MCMV-IE/IBDV-VP2 dans le site intergénique entre les COLs D et E du virus ILTV.

7.3 - Isolement et purification du virus recombinant vILTV14

- 5 Le virus vILTV14 a été isolé et purifié après cotransfection de l'ADN du plasmide pEL170 préalablement linéarisé par l'enzyme *BssHII* et de l'ADN viral, comme décrit dans l'exemple 3. Ce recombinant contient une cassette MCMV-IE/IBDV VP2 dans le site intergénique entre les COLs D et E du virus ILTV (voir exemple 5).

10 Exemple 8: Construction du plasmide donneur pEL171 pour l'insertion d'une cassette d'expression du gène HN du NDV dans le site intergénique entre les COLs D et E et isolement de vILTV15:

8.1 - Clonage du gène HN du virus de la maladie de Newcastle (NDV)

- La constitution d'une banque d'ADN complémentaire du génome du virus de la maladie de Newcastle (NDV), souche Texas, a été réalisée comme décrit par Taylor J. *et al.* (J. Virol. 1990. 64. 1441-1450). Un clone pBR322 contenant la fin du gène fusion (F), la totalité du gène hémagglutinine-neuraminidase (HN) et le début du gène de la polymérase a été identifié pHN01. La séquence du gène NDV HN contenue sur ce clone est présentée sur la figure 10 (SEQ ID NO:8). Le plasmide pHN01 a été digéré par *SphI* et *XbaI* pour isoler le fragment *SphI-XbaI* de 2520 pb. Ce fragment a été ligaturé avec le vecteur pUC19, préalablement digéré par *SphI* et *XbaI*, pour donner le plasmide pHN02 de 5192 pb. Le plasmide pHN02 a été digéré par *ClaI* et *PstI* pour isoler le fragment *ClaI-PstI* de 700 pb (fragment A). Une PCR a été réalisée avec les oligonucléotides suivants:

EL071 (SEQ ID NO:9) 5' CAGACCAAGCTTCTTAAATCCC 3'

25 EL073 (SEQ ID NO:10) 5' GTATTTCGGGACAATGC 3'

et la matrice pHN02 pour produire un fragment PCR de 270 pb. Ce fragment a été digéré par *HindIII* et *PstI* pour isoler un fragment *HindIII-PstI* de 220 pb (fragment B).

Les fragments A et B ont été ligaturés ensemble avec le vecteur pBS-SK+, préalablement digéré par *ClaI* et *HindIII*, pour donner le plasmide pEL028 de 3872 pb (figure 11). Le plasmide pHN02 a été digéré par *BspHI* et *ClaI* pour isoler le fragment *BspHI-ClaI* de 425 pb (fragment C). Une PCR a été réalisée avec les oligonucléotides suivants:

5 EL074 (SEQ ID NO:11) 5' GTGACATCACTAGCGTCATCC 3'

EL075 (SEQ ID NO:12)

5' CCGCATCATCAGCGGCCGCGATCGGTCATGGACAGT 3'

et la matrice pHN02 pour produire un fragment PCR de 465 pb. Ce fragment a été digéré par *BspHI* et *NotI* pour isoler le fragment *BspHI-NotI* de 390 pb (fragment D). Les

10 fragments C et D ont été ligaturés ensemble avec le vecteur pBS-SK+, préalablement digéré par *ClaI* et *NotI*, pour donner le plasmide pEL029bis de 3727 pb (figure 11). Le plasmide pEL028 a été digéré par *ClaI* et *SacII* pour isoler le fragment *ClaI-SacII* de 960 pb (fragment E). Le plasmide pEL029bis a été digéré par *ClaI* et *NotI* pour isoler le fragment *ClaI-NotI* de 820 pb (fragment F). Les fragments E et F ont été ligaturés
15 ensemble avec le vecteur pBS-SK+, préalablement digéré par *NotI* et *SacII*, pour donner le plasmide pEL030 de 4745 pb (figure 11).

8.2 - Construction du plasmide pEL171 contenant une cassette d'expression de HN du NDV dans le site intergénique entre les COLs D et E

20 Le plasmide pEL030 a été digéré par *NotI* pour isoler le fragment *NotI-NotI* de 1780 pb (gène NDV HN entier). Ce fragment a été inséré dans les sites *NotI* du plasmide pEL170 (exemple 7, figure 9) à la place du fragment *NotI-NotI* de 1405 pb contenant le gène codant pour la protéine VP2 de l'IBDV; ce clonage a permis d'isoler le plasmide pEL171 de 7978 pb (figure 12). Ce plasmide permet l'insertion de la cassette d'expression
25 MCMV-IE/NDV-HN dans le site intergénique entre les COLs D et E du virus ILTV.

8.3 - Isolement et purification du virus recombinant vILTV15

Le virus vILTV15 a été isolé et purifié après cotransfection de l'ADN du plasmide pEL171 préalablement linéarisé par l'enzyme *BssHII* et de l'ADN viral, comme décrit dans l'exemple 3. Ce recombinant contient une cassette MCMV-IE/NDV HN dans le site
30 intergénique entre les COLs D et E du virus ILTV (voir exemple 5).

Exemple 9: Construction du plasmide donneur pEL172 pour l'insertion d'une cassette d'expression du gène F du NDV dans le site intergénique entre les COLs D et E et isolement de vILTV16:

9.1 - Clonage du gène F du virus de la maladie de Newcastle (NDV)

- 5 * Un clone provenant de la banque d'ADN complémentaire du génome du virus de la maladie de Newcastle (voir exemple 8, paragraphe 8.1) et contenant le gène fusion (F) en entier a été appelé pNDV81. Ce plasmide a été décrit précédemment et la séquence du gène NDV F présent sur ce clone a été publiée (Taylor J. *et al.* J. Virol., 1990, 64, 1441-1450). Le plasmide pNDV81 a été digéré par *NarI* et *PstI* pour isoler le fragment
- 10 *NarI-PstI* de 1870 pb (fragment A). Une PCR a été réalisée avec les oligonucléotides suivants:

EL076 (SEQ ID N° 13) 5' TGACCCTGTCTGGGATGA 3'

EL077 (SEQ ID N° 14)

5' GGATCCCGGTCGACACATTGCGGCCGCAAGATGGGC 3'

- 15 et la matrice pNDV81 pour produire un fragment de 160 pb. Ce fragment a été digéré par *PstI* et *SalI* pour isoler le fragment *PstI-SalI* de 130 pb (fragment B). Les fragments A et B ont été ligaturés ensemble avec le vecteur pBS-SK+, préalablement digéré par *ClaI* et *SalI*, pour donner le plasmide pEL033 de 4846 pb (figure 13).

- 20 *9.2 - Construction du plasmide pEL172 contenant une cassette d'expression du gène F du NDV dans le site intergénique entre les COLs D et E*

- Le plasmide pEL033 a été digéré par *NotI* pour isoler le fragment *NotI-NotI* de 1935 pb (gène F entier). Ce fragment a été inséré dans les sites *NotI* du plasmide pEL170 (exemple 7, figure 9) à la place du fragment *NotI-NotI* de 1405 pb contenant le gène codant pour la protéine VP2 de l'IBDV; ce clonage a permis d'isoler le plasmide pEL172
- 25 de 8131 pb (figure 14). Ce plasmide permet l'insertion de la cassette d'expression MCMV-IE/NDV-F dans le site intergénique entre les COLs D et E du virus ILTV.

9.3 - Isolement et purification du virus recombinant vILTV16

Le virus vILTV16 a été isolé et purifié après cotransfection de l'ADN du plasmide

pEL172 préalablement linéarisé par l'enzyme *Bss*HII et de l'ADN viral, comme décrit dans l'exemple 3. Ce recombinant contient une cassette MCMV-IE/NDV F dans le site intergénique entre les COLs D et E du virus ILTV (voir exemple 5).

Exemple 10: Construction d'un plasmide donneur pour l'insertion d'une double cassette d'expression des gènes HN et F du NDV dans le site intergénique entre les COLs D et E et isolement d'un virus recombinant ILTV:

Une double cassette d'expression de deux gènes, par exemple les gènes HN et F du virus NDV, peut être construite. Une telle construction est schématisée à la figure 15. Dans cette construction, l'extrémité 5' des deux promoteurs sont adjacentes de manière que la transcription des deux gènes se fasse en sens opposés. Un des deux promoteurs est le promoteur MCMV IE et l'autre promoteur (appelé promoteur associé) est le promoteur SV40 (présent dans le plasmide pSVbeta, Clontech Laboratories, Palo Alto, California 94303-4607, USA). Dans cette configuration, le promoteur associé est activé par la région activatrice du promoteur CMV IE.

Cette double cassette d'expression peut ensuite être insérée dans le plasmide donneur décrit ci-dessus (pEL168 décrit dans l' exemple 5 et représenté dans la figure 3).

L'isolement des virus recombinants se fait de la même manière que ci-dessus (voir exemple 3).

Exemple 11: Construction du plasmide donneur pEL181 pour l'insertion d'une cassette d'expression du gène gB du MDV dans le site intergénique entre les COLs D et E et-isolement de vILTV17:

11.1 - Clonage du gène gB du virus de la maladie de Marek

Le fragment *Eco*RI-*Sal*I de 3,9 kpb de l'ADN génomique du virus MDV souche RB1B contenant le gène MDV gB (séquence publiée par Ross N. *et al.* J. Gen. Virol. 1989. 70, 1789-1804) a été ligaturé avec le vecteur pUC13, préalablement digéré par *Eco*RI et *Sal*I, pour donner le plasmide pCD007 de 6543 pb (figure 16). Ce plasmide a été digéré par *Sac*I et *Xba*I pour isoler le fragment *Sac*I-*Xba*I de 2260 pb (partie centrale du gène gB = fragment A). Une PCR a été réalisée avec les oligonucléotides suivants:

CD001 (SEQ ID NO:15)

5' GACTGGTACCGCGGCCGCATGCACTTTTTAGGCGGAATTG 3'

CD002 (SEQ ID NO:16) 5' TTCGGGACATTTTCGCGG 3'

et la matrice pCD007 pour produire un fragment PCR de 222 pb. Ce fragment a été digéré par *KpnI* et *XbaI* pour isoler un fragment *KpnI-XbaI* de 190 pb (extrémité 5' du gène gB = fragment B). Une autre PCR a été réalisée avec les oligonucléotides suivants:

CD003 (SEQ ID NO:17) 5' TATATGGCGTTAGTCTCC 3'

CD004 (SEQ ID NO:18)

5' TTGCGAGCTCGCGGCCGCTTATTACACAGCATCATCTTCTG 3'

et la matrice pCD007 pour produire un fragment PCR de 195 pb. Ce fragment a été digéré par *SacI* et *SacII* pour isoler le fragment *SacI-SacII* de 162 pb (extrémité 3' du gène gB = fragment C). Les fragments A, B et C ont été ligaturés ensemble avec le vecteur pBS-SK+, préalablement digéré par *KpnI* et *SacI*, pour donner le plasmide pCD011 de 5485 pb (figure 16).

11.2 - Construction du plasmide pEL181 contenant une cassette d'expression du gène gB du MDV dans le site intergénique entre les COLs D et E du virus ILTV

Le plasmide pCD011 a été digéré par *NotI* pour isoler le fragment *NotI-NotI* de 2608 pb (gène gB MDV entier). Ce fragment a été inséré dans les sites *NotI* du plasmide pEL170 exemple 7, figure 9) à la place du fragment *NotI-NotI* de 1405 pb contenant le gène codant pour la protéine VP2 de l'IBDV; ce clonage a permis d'isoler le plasmide pEL181 de 8806 pb (figure 17). Ce plasmide permet l'insertion de la cassette d'expression MCMV-IE/MDV-gB dans le site intergénique entre les COLs D et E du virus ILTV.

11.3 - Isolement et purification du virus recombinant vILTV17

Le virus vILTV17 a été isolé et purifié après cotransfection de l'ADN du plasmide pEL181 préalablement linéarisé par l'enzyme *BssHII* et de l'ADN viral, comme décrit dans l'exemple 3. Ce recombinant contient une cassette MCMV-IE/MDV gB dans le site intergénique entre les COLs D et E du virus ILTV (voir exemple 5).

Exemple 12: Construction d'un plasmide donneur pour l'insertion d'une cassette d'expression de gène(s) de l'IBV dans le site intergénique entre les COLs D et E et

isolement de virus recombinant ILTV:

Selon la même stratégie que celle décrite plus haut pour l'insertion de simples cassettes (exemples 6, 7, 8, 9 et 11) ou pour l'insertion de doubles cassettes (exemple 10), dans le site décrit ci-dessus (exemple 5), il est possible de réaliser des virus ILTV recombinaux exprimant à un niveau élevé les protéines Membrane (M) ou Spike (S), ou partie de Spike (S1 ou S2), ou Nucléocapside (N) du virus de la bronchite infectieuse aviaire (IBV). On réalise notamment une double cassette d'expression avec le gène S sous contrôle du promoteur CMV IE et le gène M sous contrôle du promoteur associé.

10 **Exemple 13: Construction de plasmides donneurs pour l'insertion de cassettes d'expression de gène(s) d'autres agents pathogènes aviaires ou de peptide immunomodulateur dans le site décrit et isolement de virus recombinants ILTV:**

15 Selon la même stratégie que celle décrite plus haut pour l'insertion de simples cassettes (exemples 6, 7, 8, 9 et 11), ou pour l'insertion de doubles cassettes (exemple 10), dans le site décrit ci-dessus (exemple 5), il est possible de réaliser des virus ILTV recombinaux exprimant à un niveau élevé des immunogènes du CAV (et notamment une double cassette d'expression des gènes codant pour VP1 et pour VP2), du virus de la pneumonivirose du poulet, ou d'autres agents pathogènes aviaires, ou encore des peptides immunomodulateurs et notamment des cytokines.

Exemple 14: Production de vaccins:

20 Les virus recombinants obtenus selon l'invention sont produits sur oeufs embryonnés. La solution virale récoltée est ensuite diluée dans une solution stabilisatrice pour la lyophilisation, répartie à raison de 1000 doses vaccinales par flacon, et enfin lyophilisée.

REVENDICATIONS

1 - Vaccin vivant recombinant aviaire comprenant, comme vecteur, un virus ILTV comprenant et exprimant au moins une séquence nucléotidique hétérologue, cette séquence nucléotidique étant insérée dans le locus d'insertion formé par l'intergène situé
5 entre les codons stop des COL D et COL E d'ILTV et qui, dans une souche d'ILTV particulière, est défini entre les nucléotides 3873 et 4260 à la SEQ ID NO:1.

2 - Vaccin vivant recombinant selon la revendication 1, caractérisé en ce que la
10 ou les séquences nucléotidiques sont insérées par insertion simple, ou après délétion totale ou partielle du locus d'insertion.

3 - Vaccin vivant recombinant selon l'une quelconque des revendications 1 à 2, caractérisé en ce que, pour exprimer la séquence nucléotidique insérée, le vecteur comprend un promoteur eucaryote fort.

4 - Vaccin vivant recombinant selon la revendication 3, caractérisé en ce que le
15 promoteur fort est choisi parmi le groupe consistant en: promoteur CMV immediate-early, de préférence le promoteur CMV immediate-early murin ou humain, promoteur LTR du virus du Sarcome de Rous (RSV), promoteur précoce du virus SV40.

5 - Vaccin vivant recombinant selon l'une quelconque des revendications 1 à 4, caractérisé en ce qu'il comprend au moins deux séquences nucléotidiques insérées dans
20 le locus d'insertion sous le contrôle de promoteurs eucaryotes différents.

6 - Vaccin vivant recombinant selon la revendication 5, caractérisé en ce que les promoteurs eucaryotes sont des promoteurs CMV immediate-early d'origines animales différentes.

7 - Vaccin vivant recombinant selon la revendication 5, caractérisé en ce qu'il
25 comprend une première séquence nucléotidique associée au promoteur CMV immediate

early et un autre promoteur sous la dépendance duquel se trouve une autre séquence nucléotidique, ces deux promoteurs étant disposés de manière que leurs extrémités 5' soient adjacentes.

5 8 - Vaccin vivant recombinant selon l'une quelconque des revendications 1 à 7, caractérisé en ce qu'il comprend, insérée dans le locus d'insertion, une cassette d'expression comprenant successivement un promoteur, deux ou plusieurs gènes séparés deux à deux par un IRES, et un signal de polyadénylation.

10 9 - Vaccin vivant recombinant selon l'une quelconque des revendications 1 à 8, caractérisé en ce qu'il comprend une séquence nucléotidique codant pour un polypeptide antigénique d'un agent pathogène aviaire, cette séquence étant insérée dans le locus d'insertion.

15 10 - Vaccin vivant recombinant selon la revendication 9, caractérisé en ce qu'il comprend une séquence codant pour un antigène d'un agent pathogène aviaire choisi parmi le groupe consistant en le virus de la maladie de Newcastle (NDV), le virus de la maladie de Gumboro (IBDV), le virus de la maladie de Marek (MDV), le virus de la bronchite infectieuse (IBV), le virus de l'anémie du poulet (CAV), le virus de la pneumovirose du poulet.

20 11 - Vaccin vivant recombinant selon la revendication 10, caractérisé en ce qu'il comprend une séquence nucléotidique, choisie parmi les séquences nucléotidiques codant pour les polypeptides F et HN du virus NDV.

12 - Vaccin vivant recombinant selon la revendication 10, caractérisé en ce qu'il comprend une séquence nucléotidique, choisie parmi les séquences nucléotidiques codant pour les polypeptides gB, gC, gD, gH+gL du virus MDV.

25 13 - Vaccin vivant recombinant selon la revendication 10, caractérisé en ce qu'il comprend au moins une séquence nucléotidique choisie parmi le groupe des séquences

correspondant aux antigènes VP2 de l'IBDV, aux antigènes S, ou partie de S, M et N du virus IBV, aux antigènes VP1 et VP2 du CAV, aux antigènes G et F du virus de la pneumovirose du poulet.

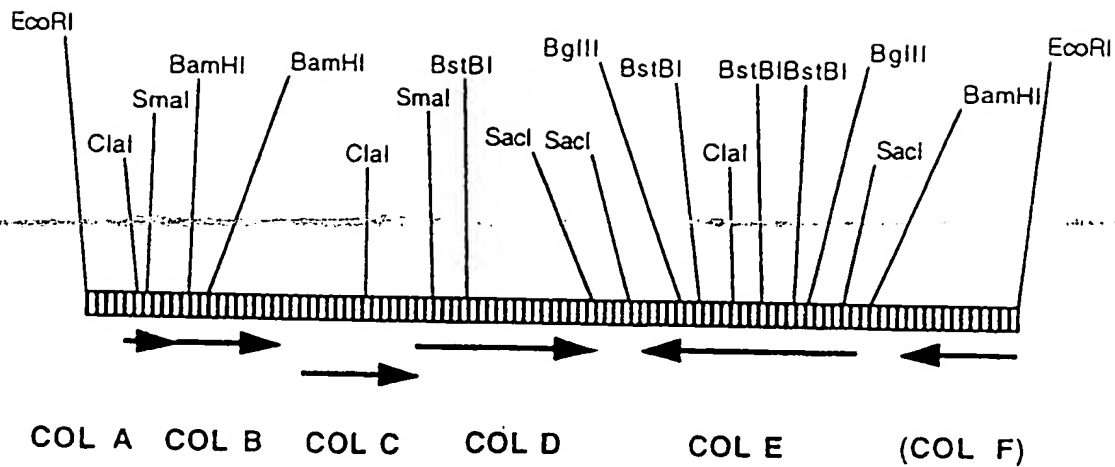
- 5 14 - Vaccin vivant recombinant selon l'une quelconque des revendications 1 à 13, caractérisé en ce qu'il comprend une séquence nucléotidique codant pour un polypeptide immunomodulateur, cette séquence étant insérée dans le locus d'insertion.

15 15 - Vaccin vivant recombinant selon la revendication 14, caractérisé en ce que cette séquence nucléotidique est choisie parmi le groupe des séquences codant pour des cytokines.

- 10 16 - Formule de vaccin multivalent comprenant, en mélange ou à mélanger, au moins deux vaccins vivants recombinants tels que définis dans l'une quelconque des revendications 1 à 15, ces vaccins comprenant des séquences insérées différentes.

- 15 17 - Un virus ILTV comprenant au moins une séquence nucléotidique hétérologue insérée dans le locus d'insertion formé par l'intergène situé entre les codons stop des COL D et COL E d'ILTV et qui, dans une souche d'ILTV particulière, est défini entre les nucléotides 3873 et 4260 à la SEQ ID NO:1.

1/25



Partie séquencée (7082 pb)

FIG. 1

2/25

FIG. 2

EcoRI

1 GAATTCTAAGCTTGCTTTGTGCAACCAGTTTGTCTTTCTTTTGGGGGAGGGTAGCACA
 61 CTCTGCCCCGAGTCTCGGCATTGACTTAACAGTGATGTGAAACCCGGAAGATCGAGCATGA
 121 ACTAATAGCATTAAAGAATTGTTATCCGAGGAATAATCGTGACCGGAATTTACTCGACC
 181 GCTAAATCTTTCTTCTACTGAGCTGGATACGTGAAATTTGGTGAGTATAACCTCTCGGG

COL A

241 ATACATAGCTTTTAAATACGGGGCGTGCAATATTAAATTCCTGCACTCGGGGCTGCAATGG
 1 MetG
 301 AGCGCGGAGCTTTATTTGACAAGACCGCCAATTGCAAGGACTGGGTCTCGATCGGGACTA
 2 LuArgGlyAlaLeuPheAspLysThrAlaAsnCysLysAspTrpValSerIleGlyThrT

Clal

361 CTGTGTGGGGCGCGATCGATGCAGATGACGGGGACGACTTAGTCTGGGATTATGAAAATA
 22 hrValTrpGlyAlaIleAspAlaAspAspGlyAspAspLeuValTrpAspTyrGluAsnS

SmaI

421 GCCCATATCCAAGCATAGTTTCTCACTATTTCCCGGGGAAGAAACGGACTCGGCAATTT
 42 erProTyrProSerIleValSerSerLeuPheProGlyGluGluThrAspSerAlaIleC
 481 GTAACCTCTGTTGTTGCCGCAAACCCCTGTAGCATACCTCCTGGGCGGCAGCGTTTGGCAT
 62 ysAsnSerValValAlaAlaAsnProCysSerIleProProGlyArgGlnArgLeuAlaT
 541 GGCCATGCTGCTGTTTTCGTCCGCCAGACAGCTTCTCCGTCCCGCGCGTGGAAGTTAATG
 82 rpProCysCysCysPheArgArgProAspSerPheSerValProArgValGluValAsnA
 601 CTCGCCTTGTGTCGCGGCTTGCACTGATAATTTTCTCATTTGCTTGTAGTGATCTGTGTTG
 102 laArgLeuValAlaAlaValAlaLeuIleIlePheSerLeuLeuValValIleCysValA

COL B

661 CGTCATATTGGGGGTAACATGTCTTCAGAGGACACATCGGGATTCCCTAACGCCCCCGCA
 122 laSerTyrTrpGly. 1 MetSerSerGluAspThrSerGlyPheLeuThrProProAla

BamHI

721 AGTGATGACGACACTGACCCTTCCGAGCCACCACCAAATTTATGGGATCCTCACCAGGAC
 15 SerAspAspAspThrAspProSerGluProProProAsnLeuTrpAspProHisGlnAsp
 781 GATTTTCCGAGGGACGCTGATTCCCCAAACCCACTTTTCTACCCCTGGGATGACTCTGTG
 35 AspPheProArgAspAlaAspSerProAsnProLeuPheTyrProTrpAspAspSerVal
 841 AATAATACTGGGATACGGGAGTAACGAAGATGACTATGTAGATATCGGAGGGGTAGGT
 55 AsnAsnThrGlyAspThrGlySerAsnGluAspAspTyrValAspMetGlyGlyValGly
 BamHI
 901 GGATCCGAAGACTATGAAGACCTCGGTACGGGCGGGGACTCTGACTATGACAATGTATCT
 75 GlySerGluAspTyrGluAspLeuGlyThrGlyGlyAspSerAspTyrAspAsnValSer
 961 ACAGCGACCGCGGGACGTTTCTTCCCTTACTTCTTGGTCATCAGAGGACCACGGC
 95 ThrAlaThrGlyGlyThrTrpPheProSerLeuThrSerTrpSerSerGluAspHisGly
 1021 CCAACTTCTCCGAAAACCCATATGCAACAACCTCAAGTAACAATTCAGCAGGATTCAGAT
 115 ProThrSerProGluAsnProMetGlnGlnLeuGlnValThrIleGlnGlnAspSerAsp
 1081 CCACAGCAGGAACCCGATCCCCAGCAAGTTCCCGGTCTCCAGCAGGAACCTGACCCCCAG
 135 ProGlnGlnGluProAspProGlnGlnValProGlyLeuGlnGlnGluProAspProGln
 1141 CAAGATCCACGAGACCTCGTGATCCTCCTCCCTATAGTCCGCCCCCAGAGGACCCTTTT
 155 GlnAspProArgGluProArgAspProProProTyrSerProProProGluAspProPhe
 1201 GGGCTCTCGCCATTTACTAGTGGGATCGCGGGGTTTGGGCCACCGTGGCGTGGCCCCAGC
 175 GlyLeuSerProPheThrSerGlyMetGlyGlyPheGlyProProTrpArgGlyProSer

3/25

FIG. 2 (suite 1)

1261 CACCCTCGTATGATGAGGCAATGGGGGATGGACCTTTTACTACGACTGGGGCTCGGCCAC
195▶ HisProArgMetMetArgGlnTrpGlyMetAspLeuLeuLeuArgLeuGlyValGlyAsp
1321 CTTGCTCACGCAGGCGCGGTCTCGCCCGTCTCGAGGTCGATCTCGGCCACGCAATTGGT
215▶ LeuAlaHisAlaGlyAlaValValAlaGlyLeuGluValAspLeuGlyAspAlaIleGly
1381 GTGCAGCAAAGTTGTGCTCAGAGGCATGTTTGTGGCATCTCTTTTGGGTGGAGTGGCCT
235▶ ValGlnGlnSerCysAlaGlnArgHisValCysGlyIleSerPheGlyLeuGluTrpPro
1441 TAATGTGTTGGTGGCTCTTGATATCTTATTTTGGCGATTGTC TGGGGACAGACTCCGGGAT
255▶ ...
1501 AAGGAAGGTTGTATCCGCATCCAGTACTCCTCAATAAAAGCGTGGTGGTGCTACACGATG
XbaI
1561 TCTGTTAATTTTACAACCTCCATTTTACAGGTGATCTAGAGAGACGCTGAGTGGCACTTGT
COL C
1621 CCCGACGGGACCATGCAGTCGAACAGCAGCGATGAGGCCAGTGTGATGATGTCGAGGAG
1▶ MetGlnSerAsnSerSerAspGluAlaGlnCysAspAspValGluGlu
1681 GGATGGTTCGTCCATAGCTCCAGGTGATGCACTGGATACAGATTTTCAATCCAGGGCCTTGT
17▶ GlyTrpSerSerIleAlaProGlyAspAlaLeuAspThrAspPheIleProGlyProCys
1741 GCCACGTCCATACATGGTATATCCAAGGCAGTTTATTTTTTTTCTGTGTGGAGTTAATCTG
37▶ AlaThrSerIleHisGlyIleSerLysAlaValTyrPhePheLeuCysGlyValAsnLeu
1801 GAGGAATGTAGTACACTCCCACAGCATGTCCAATCTCACCCATATGGACATCCTGAGCTG
57▶ GluGluCysSerThrLeuProGlnHisValGlnSerHisProTyrGlyHisProGluLeu
1861 AAATCAGGCAAATGGTACAAGAGGTTTGTCTCCGGGCTAGGCGAAATTGGAGATACAAGC
77▶ LysSerGlyLysTrpTyrLysArgPheCysSerGlyLeuGlyGluIleGlyAspThrSer
1921 CAGTGTACAGCTGACACGACTATGCTGCACTTCCGGAATGCCGGCACAGATTTTTTGGGCCT
97▶ GlnCysGlnLeuThrArgLeuCysCysThrSerGlyMetProAlaGlnIlePheGlyPro
1981 TCGAGATTCAGGTCTCTGCAACAGAAGCCAACCCATATGCGGGCCCAAGATTTGCTCACT
117▶ SerArgPheArgSerLeuGlnGlnLysProThrHisMetArgAlaGlnAspLeuLeuThr
2041 AGGCCTTGCCATATACTAGAGTTTCATGTTGGCGCTGACCTAATCAATCTTTTCTTGAT
137▶ ArgProCysHisIleLeuGluPheAspValGlyAlaAspLeuIleAsnLeuPheLeuTyr
Clal
2101 ATGGAACCATGTTTCAGGGAATCGATATTGCGTACATTTAGGATACCATAAACTAATGCC
157▶ MetGluProCysSerGlyAsnArgTyrCysValHisLeuGlyTyrHisLysThrAsnAla
2161 ATGCGTGTTTTGAGCGGTGGTGGGATTCTATGGGGCAGACTTCCGTGGAAGGACAACACC
177▶ MetArgValLeuSerGlyGlyGlyIleLeuTrpGlyArgLeuProTrpLysAspAsnThr
2221 GAGGAGCACGGGTACTCGTTGCCTATGCGAGTATTTGGGATCAAATTCCCCCATAAAGTT
197▶ GluGluHisGlyTyrSerLeuProMetArgValPheGlyIleLysLeuProHisLysVal
2281 TATGTGGCATGTCGCTGCCCTGCAACTCGGACGGAACCTATTATTTGGTGAGGGGGGGGTAT

4/25

Fig-2 (suite 2)

217▶ TyrValAlaCysArgCysProAlaThrArgThrGluLeuLeuPheGlyGluGlyGlyVal
2341 GGATTCAACGCGGAAACTTTAAACAGTGCGGACGGTTGAAAAAGAGTGTGAATGTCTC

237▶ GlyPheAsnAlaGluAsnPheLysGlnCysGlyArgLeuLysLysGluCysGluCysLeu
2401 CAGAAGGCTTGTTTTACTGACACAAACGGTGTAGGTGCGGCATGTAAGTTTACTGTATAC

257▶ GlnLysAlaCysPheThrAlaGlnThrValLeuGlyAlaAlaCysLysPheThrValTyr
COL D
2461 TCGAGCAAGGGACGAGGTCAAGAAATTCTGCTATATCAGGACCCATGAATGCTACAACGG
1▶ MetAsnAlaThrThrV
277▶ SerSerLysGlyArgGlyGlnGluIleLeuLeuTyrGlnAspPro...

2521 TAATGCCTGTAGTACTGGGTATGTTAAGTAGAGAACCCACAGGTGTGCAGGTACACTCA
6▶ alMetProValValLeuGlyMetLeuSerArgGluProHisArgCysAlaGlyThrLeuI
2581 TACTGTCCAGGTCCTCTGGAAATTGCCGTGGATTTCATGAGACCCAACACGATATTCCCA
26▶ leLeuSerArgSerSerGlyAsnCysArgGlyPheHisGluThrGlnHisAspIleProT
SmaI
2641 CTAACCCGGGTCTGTATCCTCTGTGTAATCATGAGCACCCCTTACTATGTGACAGTTACAG
46▶ hrAsnProGlyLeuTyrProLeuCysAsnHisGluHisProTyrTyrValThrValThrA
2701 ATGTATGCGGCAACTGTTGTTTCATGGCTTGAGCGGGTTTTTGGGAGAGTAGCTGCCCTG
66▶ spValCysGlyAsnCysCysSerTrpLeuGluArgValPheGlyArgValAlaAlaProA
2761 CTGGTCTAAGCTCCGTATCTGTATCCATTAAAGGCTCCACCCACAGCGGGACTGACGTGA
86▶ laGlyLeuSerSerValSerValSerIleLysGlySerThrHisSerGlyThrAspValT
2821 CAGAAGAACGTGAAGAGGACTCAGGGACACAGCAAACCTCCCACGACAAATTGCCGGAGC
106▶ hrGluGluArgGluGluAspSerGlyThrGlnGlnThrSerHisAspLysLeuProGluA
BstBI
2881 GCAACCGCATGGGAGATCAAAATTCCGAATTTGCGGGGAAGAGATCAATATTGGCCGCCTG
126▶ rgAsnArgMetGlyAspGlnAsnSerAsnLeuArgGlyArgAspGlnTyrTrpProProA
2941 CCCCACACCGTAGTCATTGTCACCTCGGATTTTATATTTCGATGAACCTGAGCCAGAAAGTG
146▶ laProHisArgSerHisCysHisSerAspPheIlePheAspGluProGluProGluSerG
3001 GGGAAGACGTGCATAACATGCATCCTCCACGAGGTGCAGATGAGCAAACAGCCGCTTCTG
166▶ lyGluAspValHisAsnMetHisProProArgGlyAlaAspGluGlnThrAlaAlaSerV
3061 TGTCAGCGCTAATGCAAAGTCTAGCACAAAGCATTTGGTGAGTGCACAAGCTATTAGCAGCA
186▶ alSerAlaLeuMetGlnSerLeuAlaGlnAlaLeuValSerAlaGlnAlaIleSerSerM
3121 TGGTCTCTGGCTCTGCTTCCTCAGTGGGCGTAGAAGTAGACTGTGGGTACAGTCAGACTC
206▶ etValSerGlySerAlaSerSerValGlyValGluValAspCysGlyTyrSerGlnThrH
3181 ATATTACAGAGGGGCCGGGAGGGAACAATTCGGTAGAGTCCCAGAAAGAGGGCCAGAGT
226▶ isIleThrGluGlyProGlyArgGluGlnPheGlyArgValProGluArgGlyProGluT
3241 ATCCTCAAGATTACTGTGATATATATGGTCCTGTAAGTAATGGGCCTGCTGGATACAGAG
246▶ yrProGlnAspTyrCysAspIleTyrGlyProValSerAsnGlyProAlaGlyTyrArgA
3301 CAGGACCACCAGATGCTCCTAGTATACAAGATAGGACCTTCCCATGCGGCAGAAGATGCG
266▶ laGlyProProAspAlaProSerIleGlnAspArgThrPheProCysGlyArgArgCysA
3361 ACCAAGCATGGCTTGCCCTTAGAAGTAGGGAATATGCCCTTGGATTTCTTCTGGTTACATA
286▶ spGluAlaTrpLeuAlaLeuGluValGlyAsnMetProTrpIleSerSerGlySerHisS
3421 GTCCACCTTCTCAGTATCATAACCCTTATGGTTCACATAGTCCACCTTCCCAGTCTCATA
306▶ erProProSerGlnTyrHisAsnProTyrGlySerHisSerProProSerGlnSerHisA
3481 ACCCTTATGGTACATATAGTCCGCCTTCTCAGTCTCATAACCCTTATGGCTCATATAGTC
326▶ snProTyrGlyThrTyrSerProProSerGlnSerHisAsnProTyrGlySerTyrSerP
3541 CGCCTTCCCAGTTCATAACCCTTGTGGTACATATAGTCCGCCTTCTCAGTCTCGTAAGC
346▶ roProSerGlnTyrHisAsnProCysGlyThrTyrSerProProSerGlnSerArgLysH

5/25

FIG. 2 (Suite 3)

3601 ATGACTATTACCTCCATATCCGATACTCAAACCAAAGCCTCGATTACCCCCAGGCTTTG
 366 ▶ *isAspTyrSerProProTyrProIleLeuLysProLysProArgLeuProProGlyPheG*
 3661 AAAATACTGCTGGGATGTGGCCTCGATGTCCCCCTGGGTTTGAGGGGCGTCCATACAAAT
 386 ▶ *luAsnThrAlaGlyMetTrpProArgCysProProGlyPheGluGlyArgProTyrLysS*
 3721 CTGGGGGCATGGGTAACCTTCTCCTGGAAGTGCATGGACGGTAATAGATAGGGGGTCTAACC
 406 ▶ *erGlyGlyMetGlyAsnPheProGlySerAlaTrpThrValIleAspArgGlySerAsnG*
 3781 AATGGCCAGCAGACGTGCGGGGGCCATTCTCAGATCAACGATGGGCCCCACAGAGCATG
 426 ▶ *lnTrpProAlaAspValArgGlyProPheSerAspGlnArgTrpAlaProThrGluHisG*
 SacI
 3841 AAACGCGACGTTTTTGCGGGTATTACAGCTGAGCTCTCATCATACCCATAACTCCACTCA
 446 ▶ *luThrArgArgPheCysGlyTyrTyrSer...*
 3901 TAACCCAAGGCCCATAAATCCATAACTCATAACATAAAATTCATACTTTCCGGTTCGTCCAG
 3961 GGCACCACGTCATCAACAAGGATTGCAGATAAATAAAAAATGCTCCACGTTGTCCGGTGTCC
 4021 GTTGTATTGTATTCTTTATTATACCTCCGTAATTTTCGAGAGTCCGGGAACATTCTAAAA
 4081 ATTTTAAAGCTGCAATACTACAGTGTATTTACAAGGCGCGATTGCAACAGTGAACCTCAT
 SacI
 4141 ACATCATTGAGCTCGCGGCGCCATCTGCTGACCAGTCCACAGAGATGGCAATCTTCAGAA
 4201 ACGTAGGATGGCACCAATTCCAATACAATACCGCCATCTGTCGATAGGTGTATAGAACTG
 4261 TCAAAACAAGTCGCAAGAGAAAAATTTCCCTACTGTATACTGGCGGCTTAGCAGCTGCGC
 545 ▶ *...PheLeuAspCysSerPhePheLysGlyValThrTyrGlnArgSerLeuLeuGlnAla*
 4321 ACAAACCACTCTGCATTCTCTTTGCGGCACACATTTGCGTGCTGCGCCAGAACGAGTGG
 525 ▶ *CysValValArgCysGluGluLysArgCysValAsnAlaHisGlnAlaLeuValLeuPro*
 4381 GATTTTTTTTAGAACAGGTCCCAGGATAGTACATGTCCCACAATGTTCTGGCCGGTCTAT
 505 ▶ *IleLysLysSerCysThrGlyProTyrTyrMetAspTrpLeuThrArgAlaProAspIle*
 4441 TGCTTTATGATTTCATGACCATGGCCTCTGGTCGCGGATACACAATTCTTGAGAACCGGTC
 485 ▶ *AlaLysHisAsnMetValMetAlaGluProArgProTyrValIleArgSerPheArgAsp*
 BglII
 4501 GAAGAAGGTCAGTAATAAAGTTAAAGGACATTTTTCGCTACTCAGCGATAGCTCCTGAGA
 465 ▶ *PhePheThrLeuLeuLeuThrLeuProCysLysAlaSerSerLeuSerLeuGluGlnSer*
 4561 TCTAGTGGTATCTCTTAGTTGACTGCCAATGCTAGAGAGATAACACGGCAGGATTGGCCC
 445 ▶ *ArgThrThrAspArgLeuGlnSerGlyIleSerSerLeuTyrCysProLeuIleProGly*
 4621 CAGATGCATGGCTAGAGATTGACATGCGCAGTAGATGTTAGAGAAGATAGGATCGTGGGG
 425 ▶ *LeuHisMetAlaLeuSerGlnCysAlaCysTyrIleAsnSerPheIleProAspHisPro*
 BstBI SphI
 4681 GTAAATCCTTTTCATCTTCGAACCTGATGCCAAAGCATCCATACAAGTGTCTCATCGCATGC
 405 ▶ *TyrIleArgGluAspGluPheGlnHisTrpLeuMetTrpValLeuThrGluAspCysAla*
 4741 AAAAAGTAGCTCTTCAAATGAGCAGTTCGCCAAATATACAGCTCGTGAAATTTTGCCAA
 385 ▶ *PheLeuLeuGluGluPheSerCysAsnAlaLeuTyrValAlaArgSerIleLysAlaLeu*
 4801 CCTGGCTATATCCGGACGCGATGTCCAGCGGCTTTTCAGTGAAGCTGCGGCGCCACAAAA
 365 ▶ *ArgAlaIleAspProArgSerThrTrpArgGlyLysLeuSerAlaAlaArgGlyCysPhe*
 4861 CTGCTTCCACGAAGTGAATGCAGCATCTGCTGCAAGGTCAGATGATCCCGAAGACAAAA
 345 ▶ *GlnLysTrpSerThrPheAlaAlaAspAlaAlaLeuAspSerSerGlySerSerLeuPhe*
 Clal
 4921 TGCTGGAAAGCAGATTCTCTATCAGATCGATATCATCACAATCATCATCCACTGC
 325 ▶ *AlaProPheCysIleGlyArgAspArgAspIleAspAspCysAspAspAspValAla*
 4981 CCGGTTTACCATGTCTAAAAGACATTTCTGATTTTCTAATCTTAACCTCTCAGTAATGCA
 305 ▶ *ArgAsnValMetAspLeuLeuCysLysGlnAsnGluLeuArgLeuGluGluThrIleCys*

FIG. 2 (SUITE 4)

6/25

5041 CTTTCCGAGACCGCCAAATGCAGTTGCGGCCCTTTTCAAATATTGGGCCGGTGTACGTT
 285 LysGlyLeuGlyGlyPheAlaThrAlaAlaLysGluPheTyrGlnAlaProThrValAsn
 5101 TCGCAACTCCTTCGTTTCGGTCCGTGATGACGTTGGGCATCGGACAAAGTCTCTCCAAAT
 265 ArgLeuGluLysThrGluThrArgSerSerThrProCysArgValPheAspArgTrpIle

BstBI

5161 CGGTCTTCGAAGTTCATCCCGATTCTTTCCCAAGACCTGCGCGAATGCTTCAACGAAAC
 245 ProArgArgLeuGluAspArgAsnArgGluTrpSerArgArgSerHisLysLeuSerVal
 5221 AGTAAAGATAGGCGCCCTATATCGCTTTTCTGGTGTACCTGCACGGCGCCTGGGTCTAGG
 225 ThrPheIleProAlaArgTyrArgLysGluProThrGlyAlaArgArgArgProArgPro
 5281 GGGGATGCCTCTTCGGACTTGGATATGCGCACGGCCTCTCATAAACTTATTTTCGAGGGCT
 205 ProIleGlyArgArgValGlnIleHisAlaArgGlyArgMetPheLysAsnArgProSer
 5341 ACTGACCCGCCTTATGGAAGACCGTACGCTCATACCTGACTGGTTCTCGTAACGGGAACG
 185 SerValArgArgIleSerSerArgValSerMetGlySerGlnAsnGluTyrArgSerArg

BstBI

5401 AGGCTCGCCATTTCGAATAGCGACGGCGCCCCCTGTCACGTGAATCACGGACTCGTTTGA
 165 ProGluGlyAsnSerTyrArgArgArgGlyArgAspArgSerAspArgValArgLysSer

EgIII

5461 GCTACCGCGCCAGATGACCGGGATCTGGAGCTACTTTCTGTAGAATGAGATCTGCGGCG
 145 SerGlyArgGlySerSerArgSerArgSerSerSerGluThrSerHisSerArgArgArg
 5521 AATACAATGTGCTTCGTGGCGGGATTCTGACCTCGAGCGTGAACGGCCATCCAGGCGATC
 125 IleCysHisAlaGluHisArgSerGluSerArgSerArgSerArgGlyAspLeuArgAsp
 5581 TTTTGTCTCTTCCGTTGCTGATCTCGCTTCGCTATGAGTACTGTATTGGAAGATGATCT
 105 LysThrArgGluThrAlaSerArgAlaGluSerHisThrSerThrAsnSerSerSerArg
 5641 GGAACGTGTCTCAGCCTATCTTTATTTATTCAGATTCTCCGGTCTCCCCATCGCAGT
 85 SerArgThrGluArgArgAspLysAsnIleGlySerLysGluProArgGlyMetAlaThr
 5701 CAGTGGGTGTGATGTACCGCGTGCACGTCAAAAAAATGAAACCGCATACACAACGGTTGA
 65 LeuProAsnIleTyrArgThrCysThrLeuPhePheSerValAlaTyrValValThrSer

SacI

5761 GACTTCTACGGACTCAGAACAGGTGTGCGAGCTCGGAGCAGGTGCTGAGAGGTAAGCTGAC
 45 ValGluValSerGluSerCysThrAspLeuGluSerCysThrSerLeuProLeuSerVal
 5821 AGTAATCTGGCAGCTGTTTTCGAGCTAATCCACTTGGCTTTTGAATGGTCTGGGCCACT
 25 ThrIleGlnCysAlaThrGlnSerSerIleTrpLysAlaLysSerHisAspProGlySer

COL E

5881 CCCAGTATACGTACATAACACATACACTGGAACCCACAACTACAATTGCGGTCCAGTAGT
 5 GlyThrTyrThrMet

BamHI

5941 TGGTGCAGAAATATTACGCAGACATAATAATCTGCGAGAACTTCTGCGGATCCGACATGT
 6001 AACTTAATCCCGTAATGTAGTGGGCATACCGTCTAAACCGCAAACATCCGCTTAGTAGA
 6061 ACACGCCCTAAATACCCACGAGTATACTTTGTACATTCTGACCGCCAGATGTTACTCC
 6121 TTTCAAACAATGATACTCAGCCGTTAGAACTAGGGCTGTCTTCAAATGGACCAAATTCAG
 6181 ACACAATACCGCACACGTTTAAACATTTTATTGCCGTTCAAGGCCCGAACAATTTGT
 287 ...ProGlyPheLeuLysAs

6241 TTTGTATCTTCTGTTTCGTATTTAAATGCAATTATTACAATGCTCGCAATCCGAGCCACGC
 280 nGlnIleLysGlnGluTyrLysPheAlaIleIleValIleSerAlaIleAlaAlaValCy
 6301 ACAATGCACGCAAGACTAAGCTCGAAGCAATATTGGCAAGGCATGAAGTCAAGATACTGG
 260 sLeuAlaArgLeuValLeuSerSerAlaIleAsnAlaLeuCysSerThrLeuIleSerPr
 6361 GAGGTTTCGATGCGGAGACTTTAGTCTTTGCGGAGTCTGTAAACCATCAGTGATAAGA
 240 oProLysSerAlaSerValLysThrLysAlaProThrThrTyrGlyMetLeuSerLeuLe

XbaI

6421 GTTCTAGAACCCTGAGACAATTACATATACCCAAGCACTAATTTTACGTGTTTCATGTA
 220 uGluLeuValAlaSerValIleValTyrValTrpAlaSerIleLysValHisGluHisLe

7/25

Fig. 2 (FIN)

6481 AAATATATGCACACGGATCATAGCAAATCCGCAATGTCATGGTGGACATAATAAGCGATG
200 u Ile Tyr Ala Cys Pro Asp Tyr Cys Ile Arg Leu Thr Met Thr Ser Met Ile Leu Ser Al
6541 CTAAATATAAACCGATCTCGAGTGTTCAGTAGTAAGACCCCTGGATTACAGACGCAAA
180 a Leu Tyr Leu Gly Ile Glu Leu Thr Lys Leu Leu Val Gly Pro Asn Cys Val Cys Ph
6601 ATCCTAGAGGGTCTGCTACGTAGTTCAAGCTTTTGCAATCTCGGAGATGTTCAAATTCCC
160 e Gly Leu Pro Asp Ala Val Tyr Asn Leu Ser Lys Cys Asp Arg Leu His Glu Phe Glu Ar
6661 TCAAAAACCGTTGCATCTTTGTGTATGGCACCCGTAATATCAGCCTCGAAGTAAACGCTG
140 g Leu Phe Arg Gln Met Lys Thr Tyr Pro Val Arg Leu Ile Leu Arg Ser Thr Phe Ala Th
6721 TCCAGTAGTTAAGATGATATGCATCCATCGCAATGCGTTCTCGCGGCAGACATAGCCCCGA
120 r Trp Tyr Asn Leu His Tyr Ala Asp Met Ala Ile Arg Glu Arg Pro Leu Cys Leu Gly Ph
6781 ACATTCGCCTCTGGCGACGGGTCAGCAAGTAACATATGTACAATACCGTCGAAATGAATG
100 e Met Arg Arg Gln Arg Arg Thr Leu Leu Tyr Cys Ile Tyr Leu Val Thr Ser Ile Phe Al
6841 CAACTCTGATCTGGGAAAACCATATGTAAAGCAGACAGTCTGCCACTTCCATGACGAATA
80 a Val Arg Ile Gln Ser Phe Trp Ile Tyr Leu Leu Cys Asp Ala Val Glu Met Val Phe Va
6901 CTGTTCTTTGGCCGGTGGGATCAAGACGAGAAATGAGTACAGTCTCATTTTCAAAAATAAG
60 l Thr Arg Gln Gly Thr Pro Asp Leu Arg Ser Ile Leu Val Thr Glu Asn Glu Phe Tyr Al
6961 CTCCTTTAACACATCTCGTCTGGTGGTTCTCGTAGTTGTTTAGACGCTGTGTATATTTTG
40 a Gly Lys Val Cys Arg Thr Gln His Asn Glu Tyr Asn Asn Leu Arg Gln Thr Tyr Lys Th
EcoRI
7021 TGAGGACATAAACTAGTGAAGAATTAAATGTAGCGGGCGGTTGGTGAACAGGATTGAATT
20 r Leu Val Tyr Val Leu Ser Ser Asn Phe Thr Ala Pro Pro Gln His Val Pro Asn Phe Gl
(COL F)
7081 CC
0 u

8/25

I-PCR

matrice pEL133

1-PCR EL005/EL006

Digestion

BstBI-EcoRI

2-PCR EL007/EL008

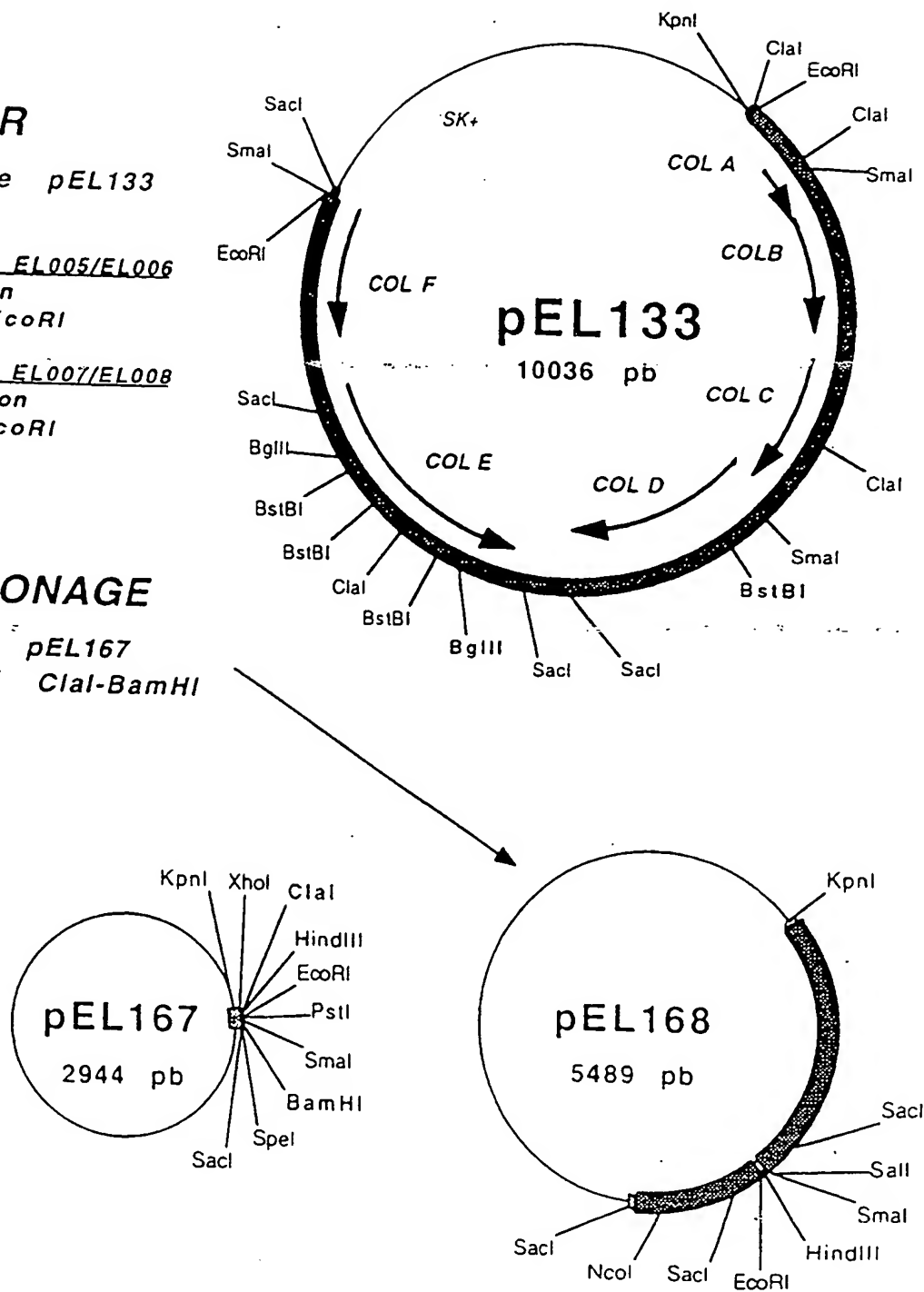
Digestion

BglII-EcoRI

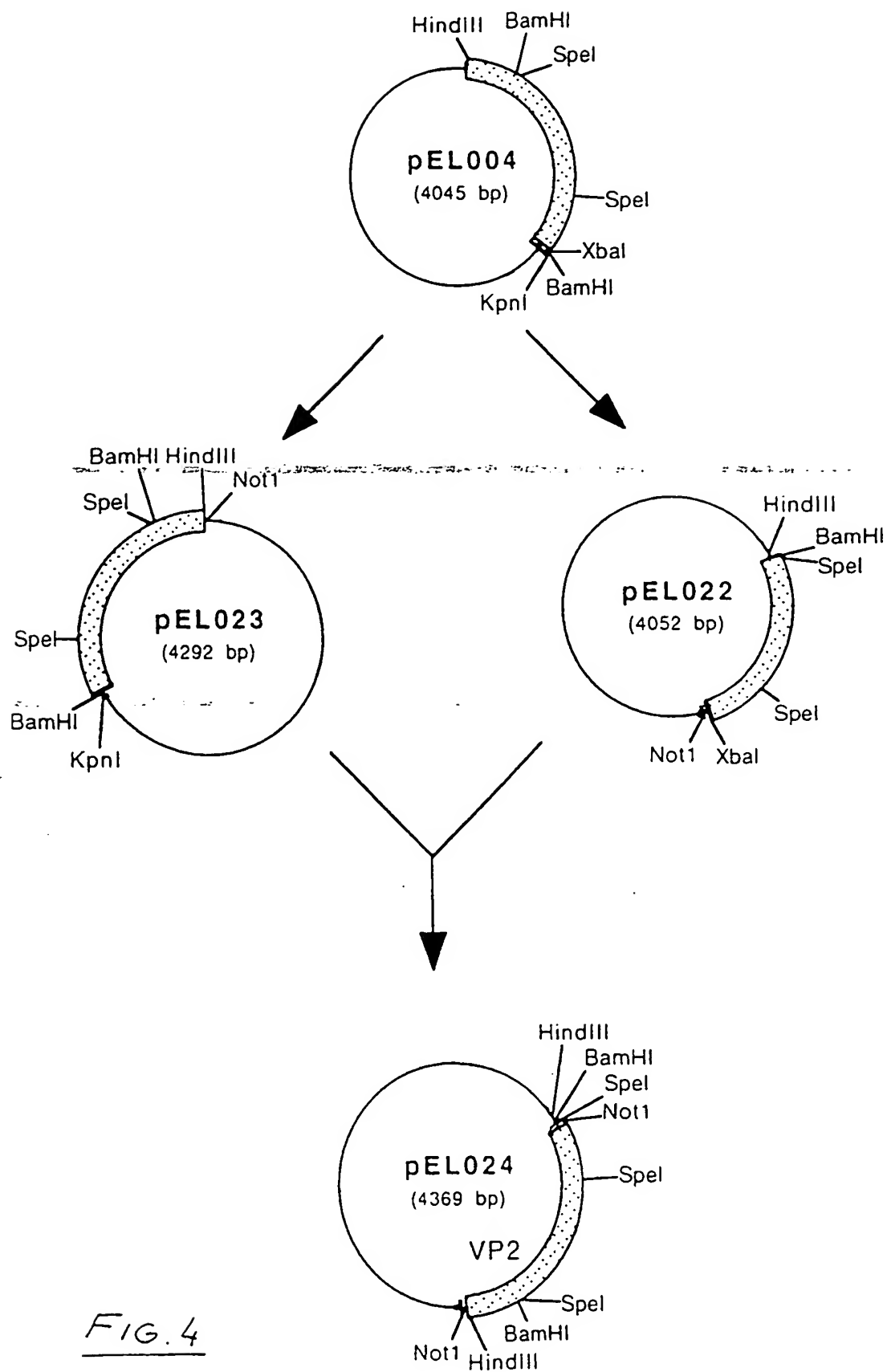
II-CLONAGE

dans pEL167

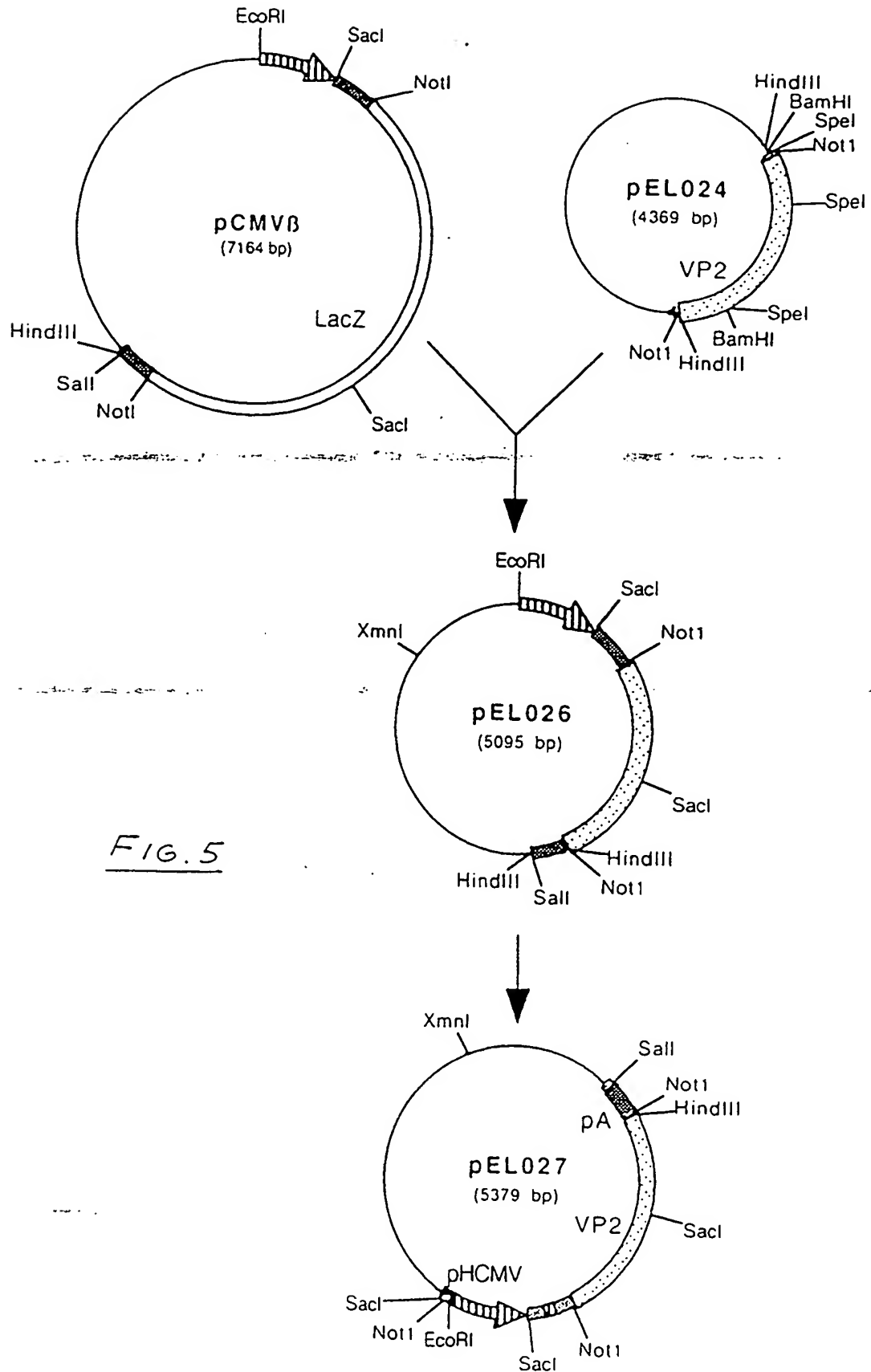
digéré ClaI-BamHI

FIG. 3

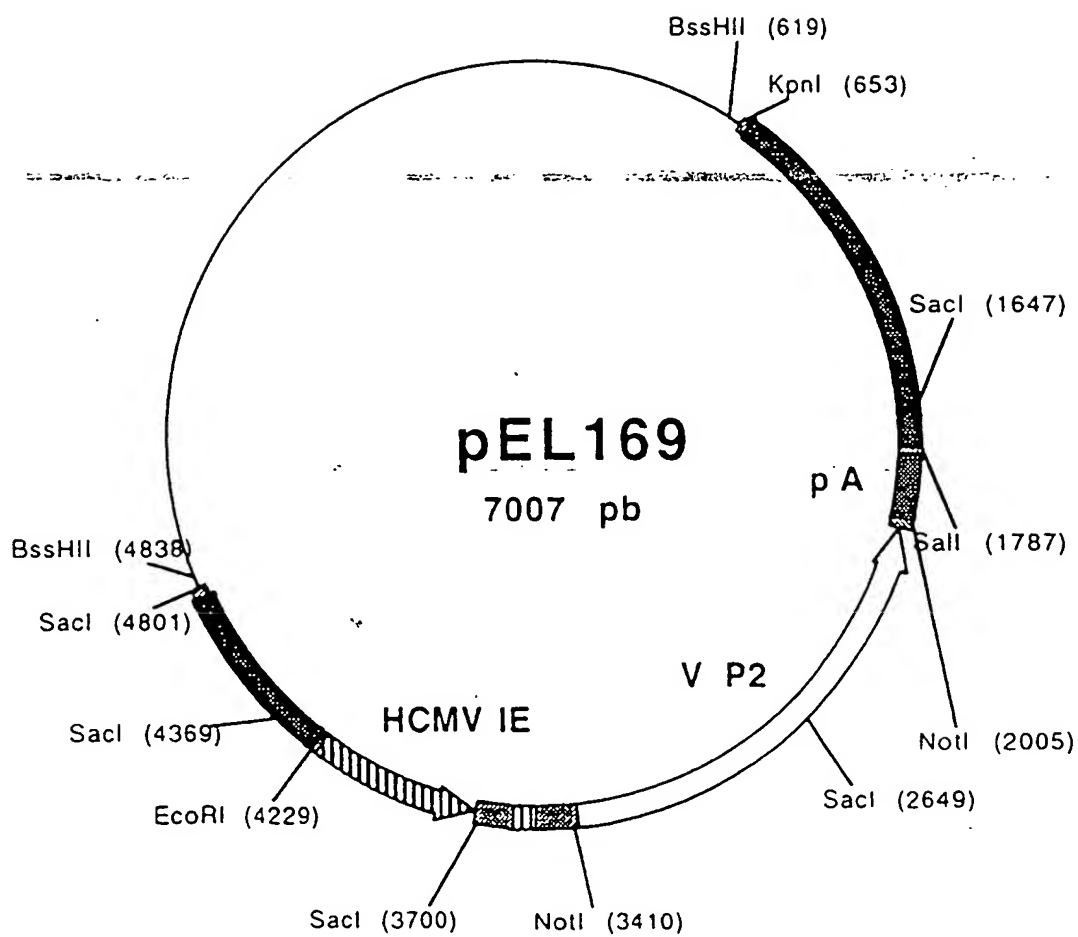
9/25

FIG. 4

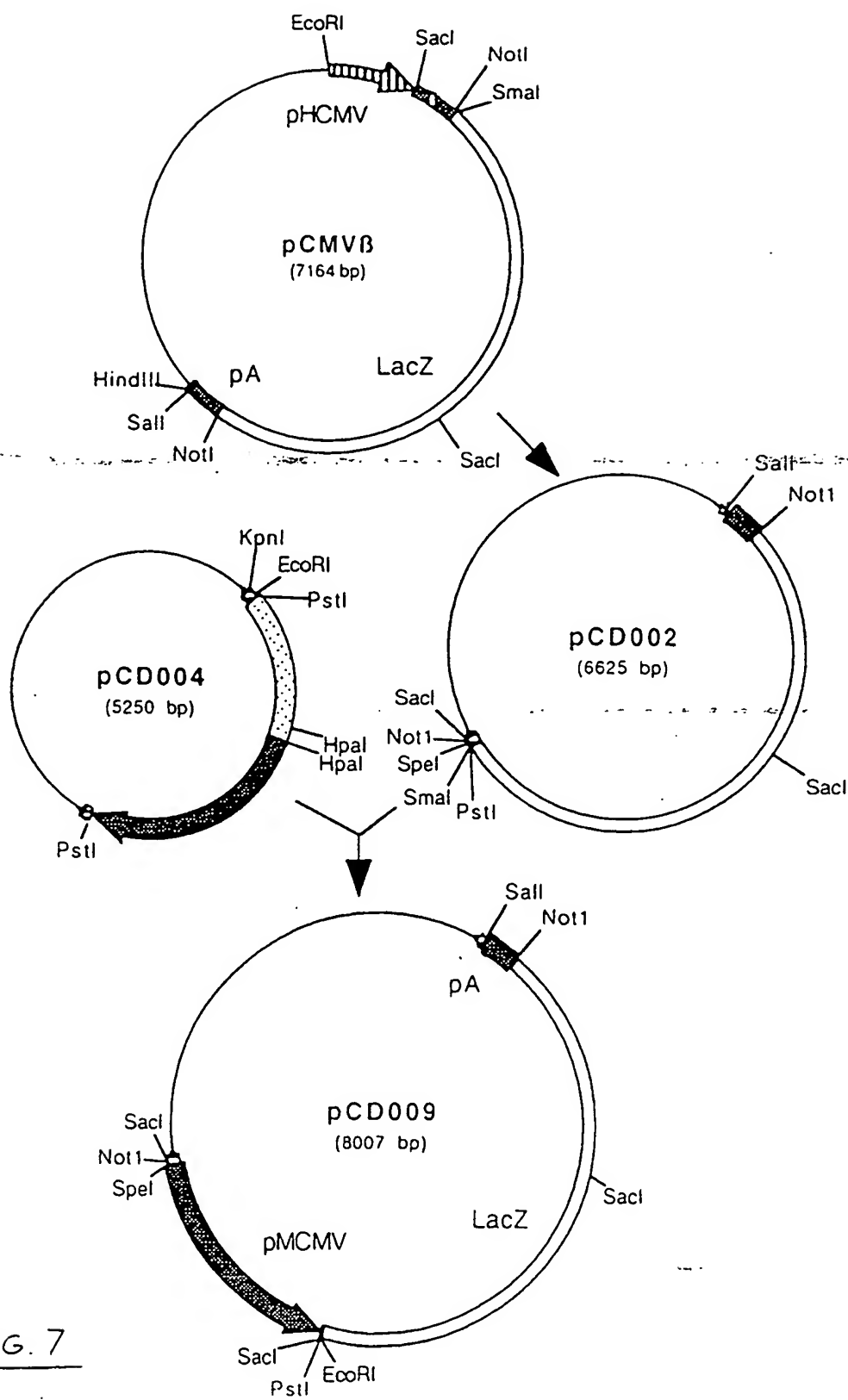
10/25

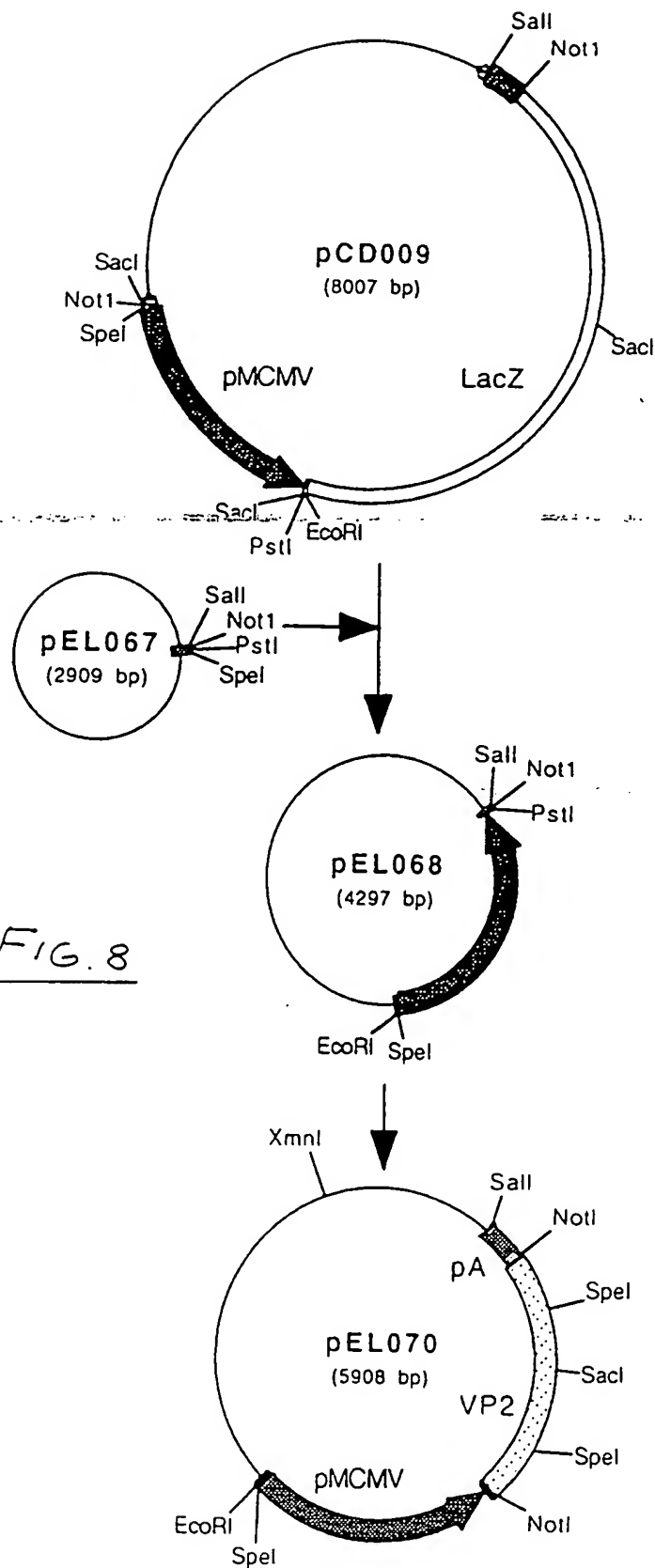
FIG. 5

11/25

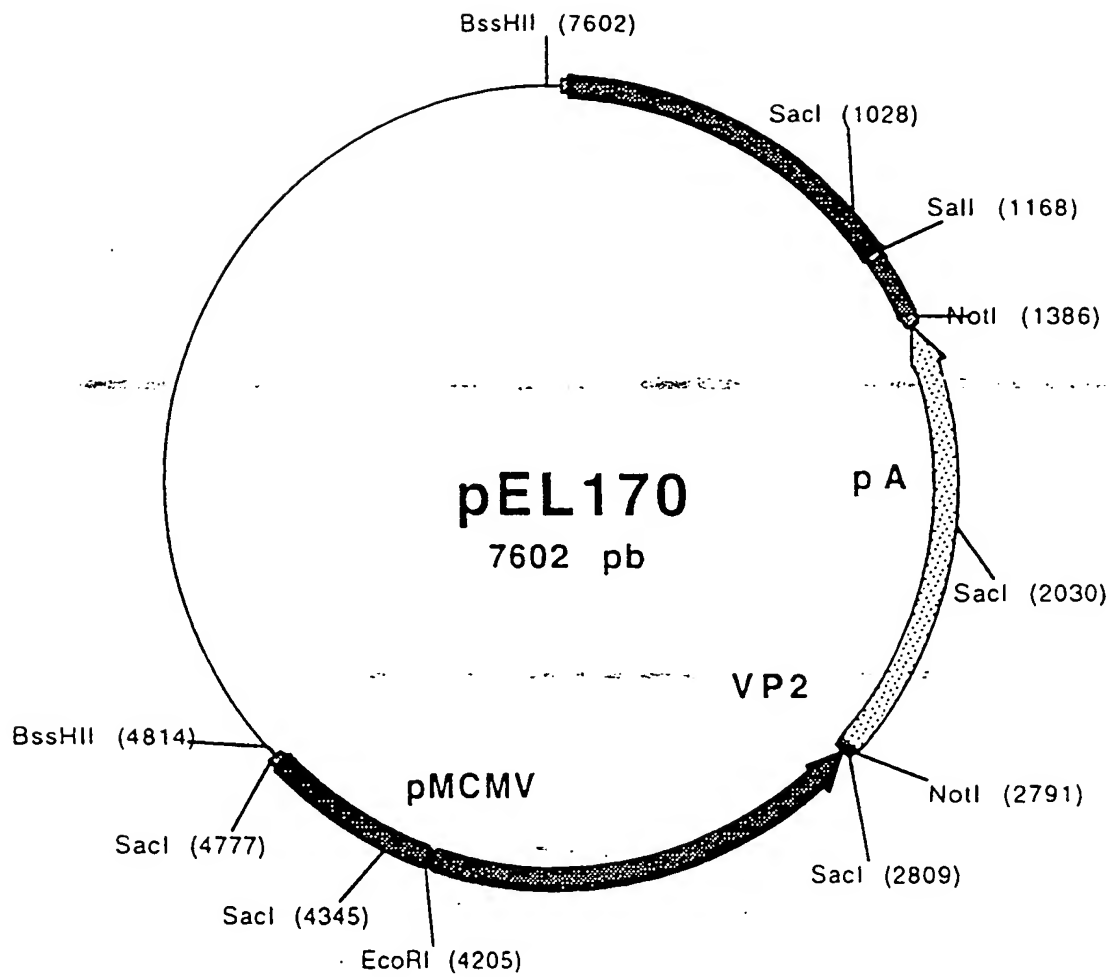
FIG. 6

12/25

FIG. 7



14/25

FIG. 9

15/25

FIG. 10

1 TGCTACCTGATGTACAAGCAAAAGGCACAACAAAAGACCTTGTTATGGCTTGGGAATAAT
 61 ACCCTTGATCAGATGAGAGCCACTACAAAAATATGAATACAAACGAGAGGCGGAGGTATC
 121 CCCAATAGCAATTTGCGTGTAATTCTGGCAACCTGTTAATTAGAAGAATTAAGAAAAAA
 181 CCACTGGATGTAAGTGACAAACAAGCAATACACGGGTAGAACGGTCCGAGAAGCCACCCC
 241 TCAATCGGGAATCAGGCCTCACAACGTCTTTCTACCGCATCATCAATAGCAGACTTCGG
 301 TCATGGACCGTGCAGTTAGCAGAGTTGCGCTAGAGAATGAAGAAAGAGAAGCAAAGAATA
 1 MetAspArgAlaValSerArgValAlaLeuGluAsnGluGluArgGluAlaLysAsnT
 361 CATGGCGCTTTGTATTCCGGATTGCAATCTTACTTTTAATAGTAACAACCTTAGCCATCT
 20 hrTrpArgPheValPheArgIleAlaIleLeuLeuLeuIleValThrThrLeuAlaIleS
 421 CTGCAACCGCCCTGGTATATAGCATGGAGGCTAGCACGCTGGCGACCTTGTTGGCATAAC
 40 erAlaThrAlaLeuValTyrSerMetGluAlaSerThrProGlyAspLeuValGlyIleP
 481 CGAGTACGATCTCTAAGGCAGAAGAAAAGATTACATCTGCACTCAGTTCTAATCAAGATG
 60 roThrMetIleSerLysAlaGluGluLysIleThrSerAlaLeuSerSerAsnGlnAspV
 541 TAGTAGATAGGATATATAAGCAGGTGGCCCTTGAGTCTCCATTGGCGTTGCTAAACACTG
 80 alValAspArgIleTyrLysGlnValAlaLeuGluSerProLeuAlaLeuLeuAsnThrG
 601 AATCTGTAATTATGAATGCAATAACGTCTCTCTCTTATCAAATCAATGGAGCTGCAAATA
 100 luSerValIleMetAsnAlaIleThrSerLeuSerTyrGlnIleAsnGlyAlaAlaAsnA

BspHI

661 ATAGCGGGTGTGGGGCACCTGTTTCATGACCCAGATTATATCGGGGGGATAGGCCAAAGAAC
 120 snSerGlyCysGlyAlaProValHisAspProAspTyrIleGlyGlyIleGlyLysGluL
 721 TTATTGTGGATGACGCTAGTGATGTCACATCATTCTATCCCTCTGCGTTCCAAGAACACC
 140 euIleValAspAspAlaSerAspValThrSerPheTyrProSerAlaPheGlnGluHisL
 781 TGAACCTTATCCCGGCACCTACTACAGGATCAGGTTGCACTCGGATACCCTCATTCGACA
 160 euAsnPheIleProAlaProThrThrGlySerGlyCysThrArgIleProSerPheAspI
 841 TAAGCGCTACCCACTACTGTTACACTCACAATGTGATATTATCTGGTTGCAGAGATCACT
 180 leSerAlaThrHisTyrCysTyrThrHisAsnValIleLeuSerGlyCysArgAspHisS
 901 CACACTCATATCAGTACTTAGCACTTGGCGTGCTTCGGACATCTGCAACAGGGAGGGTAT
 200 erHisSerTyrGlnTyrLeuAlaLeuGlyValLeuArgThrSerAlaThrGlyArgValP
 961 TCTTTTCTACTCTGCGTTCCATCAATTTGGATGACAGCCAAAATCGGAAGTCTTGCACTG
 220 hePheSerThrLeuArgSerIleAsnLeuAspAspSerGlnAsnArgLysSerCysSerV
 1021 TGAGTGCAACTCCCTTAGGTTGTGATATGCTGTGCTCTAAAATCACAGAGACTGAGGAAG
 240 alSerAlaThrProLeuGlyCysAspMetLeuCysSerLysIleThrGluThrGluGluG

ClaI

1081 AGGATTATAGTTCAATTACGCCTACATCGATGGTGCACGGAAGGTTAGGGTTTGACGGTC
 260 luAspTyrSerSerIleThrProThrSerMetValHisGlyArgLeuGlyPheAspGlyG
 1141 AATACCATGAGAAGGACTTAGACGTCATAACTTTATTTAAGGATTGGGTGGCAAATTACC
 280 lnTyrHisGluLysAspLeuAspValIleThrLeuPheLysAspTrpValAlaAsnTyrP
 1201 CAGGAGTGGGGGGTGGGTCTTTTATTAACAACCGCGTATGGTTCCCAGTCTACGGAGGGC
 300 roGlyValGlyGlyGlySerPheIleAsnAsnArgValTrpPheProValTyrGlyGlyL
 1261 TAAAACCCAATTTCGCTAGTGACACCGCACAGAAGGGAGATATGTAATATACAAGCGCT
 320 euLysProAsnSerProSerAspThrAlaGlnGluGlyArgTyrValIleTyrLysArgT
 1321 ACAATGACACATGCCAGATGAACAAGATTACCAGATTCCGATGGCTAAGTCTTCATATA
 340 yrAsnAspThrCysProAspGluGlnAspTyrGlnIleArgMetAlaLysSerSerTyrL
 1381 AGCCTGGGCGGTTTGGTGGAAAACCGGTACAGCAGGCCATCTTATCTATCAAGGTGTCAA
 360 ysProGlyArgPheGlyGlyLysArgValGlnGlnAlaIleLeuSerIleLysValSerT
 1441 CATCTTTGGGCGAGGACCCGGTGCTGACTGTACCGCTAATACAATCACACTCATGGGGG
 380 hrSerLeuGlyGluAspProValLeuThrValProProAsnThrIleThrLeuMetGlyA
 1501 CCGAACGGAGAGTTCTCACAGTAGCGACATCTCATTTCTTGTACCAGCGAGGCTCTTCAT
 400 laGluArgArgValLeuThrValGlyThrSerHisPheLeuTyrGlnArgGlySerSerT

16/25

FIG. 10 (FIN)

1561 ACTTCTCTCCTGCTTTATTATACCCTATGACAGTCAACAACAAAACGGCTACTCTTCATA
420 ▶ yrPheSerProAlaLeuLeuTyrProMetThrValAsnAsnLysThrAlaThrLeuHisS
1621 GTCCTTACACATTCAATGCTTTCACTAGGCCAGGTAGTGTCCCTTGTTCAGGCATCAGCAA
440 ▶ erProTyrThrPheAsnAlaPheThrArgProGlySerValProCysGlnAlaSerAlaA
1681 GATGCCCCAACTCATGTGTCACTGGAGTTTATACTGATCCGTATCCCTTAGTCTTCCATA
460 ▶ rgCysProAsnSerCysValThrGlyValTyrThrAspProTyrProLeuValPheHisA
1741 GGAACCATACCTTGCGGGGGGTATTCGGGACAATGCTTGATGATGAACAAGCAAGACTTA
480 ▶ rgAsnHisThrLeuArgGlyValPheGlyThrMetLeuAspAspGluGlnAlaArgLeuA
PstI
1801 ACCCTGTATCTGCAGTATTTGATAACATATCCCGCAGTCGCATAACCCGGGTAAGTTCAA
500 ▶ anProValSerAlaValPheAspAsnIleSerArgSerArgIleThrArgValSerSers
1861 GCCGTACTAAGGCAGCATAACGACATCGACATGTTTTAAAGTTGTCAAGACCAATAAAA
520 ▶ erArgThrLysAlaAlaTyrThrThrSerThrcysPheLysValValLysThrAsnLysT
1921 CATATTGCCTCAGCATTGCAGAAATATCCAATACCCTCTTCGGGGAATTCAGGATCGTTC
540 ▶ hrTyrCysLeuSerIleAlaGluIleSerAsnThrLeuPheGlyGluPheArgIleValP
1981 CTTTACTAGTTGAGATTCTCAAGGATGATGGGATTTAAGAAGCCAGGTCTGGCCAGTTGA
560 ▶ roLeuLeuValGluIleLeuLysAsp
2041 GTCAACTGCGAGAGGGTCGGAAAGATGACATTGTGTCACCTTTTTTTTTTGTAAATGCCAAGG
2101 ATCAAACCTGGATACCGGCGCGAGCCCGAATCCTATGCTGCCAGTCAGCCATAATCAGATA
2161 GTACTAATATGATTAGTCTTAATCTTGTCGATAGTAACTTGGTTAAGAAAAAATATGAGT
2221 GGTAGTGAGATACAGAGCTAAACAACACGAGAGATAGCACGGGTAGGACATGGCGAGC
2281 TCCGGTCCCGAAAGGGCAGAGCATCAGATTATCCTACCAGAGTCACATCTGTCTCCTACCA
2341 TTGGTCAAGCACAACTGCTCTATTACTGGAAATTAAGTGGCGTACCGCTTCCTGACGAA
2401 TGTGACTTCGACCACCTCATTATCAGCCGACAATGGAAGAAAATACTTGAATCGGCCACT
2461 CCTGACACTGAGAGGATGATAAAGCTCGGGCGGGCAGTACACCAGACTCTCGACCACCGC
2521 C

17/25

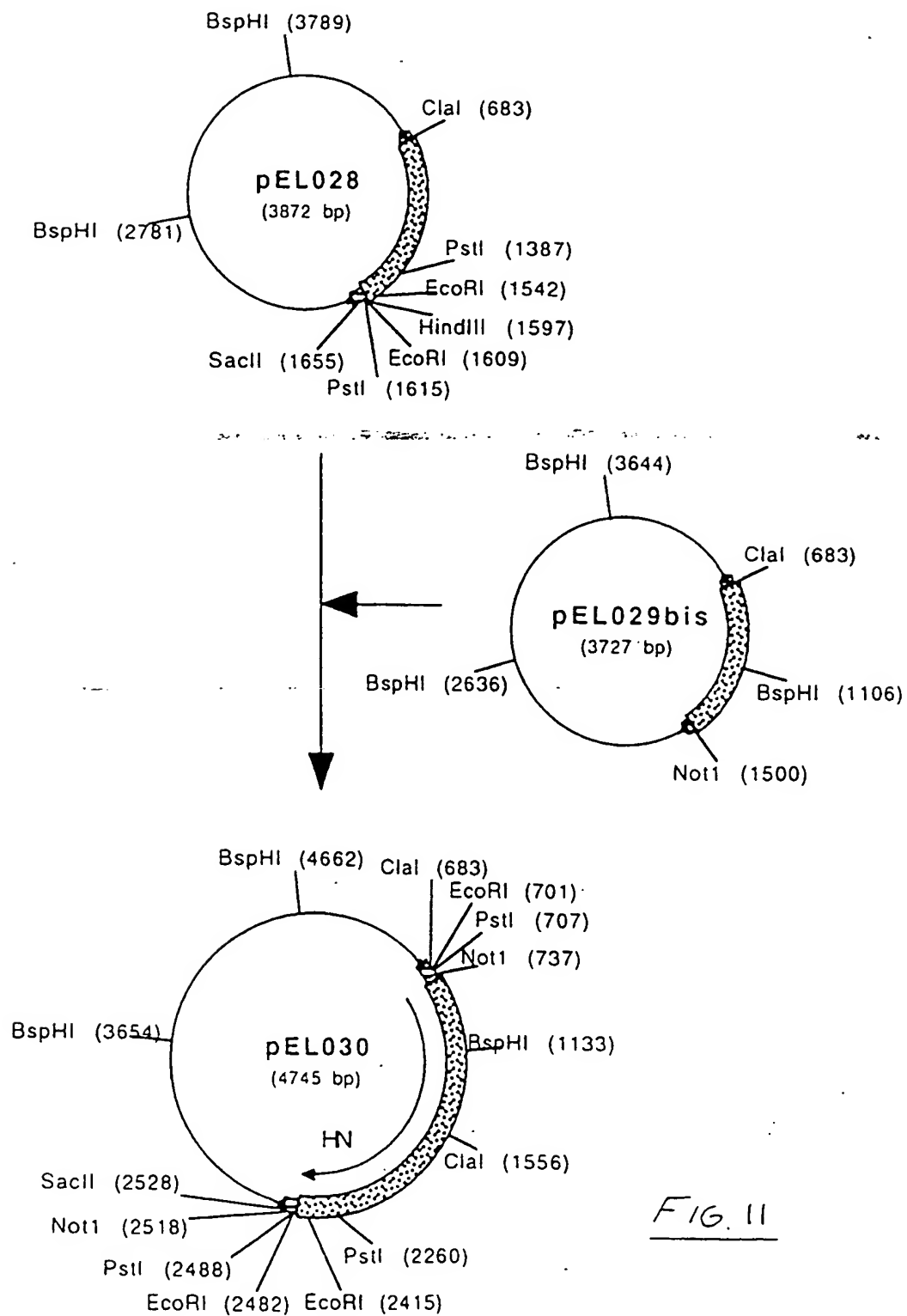
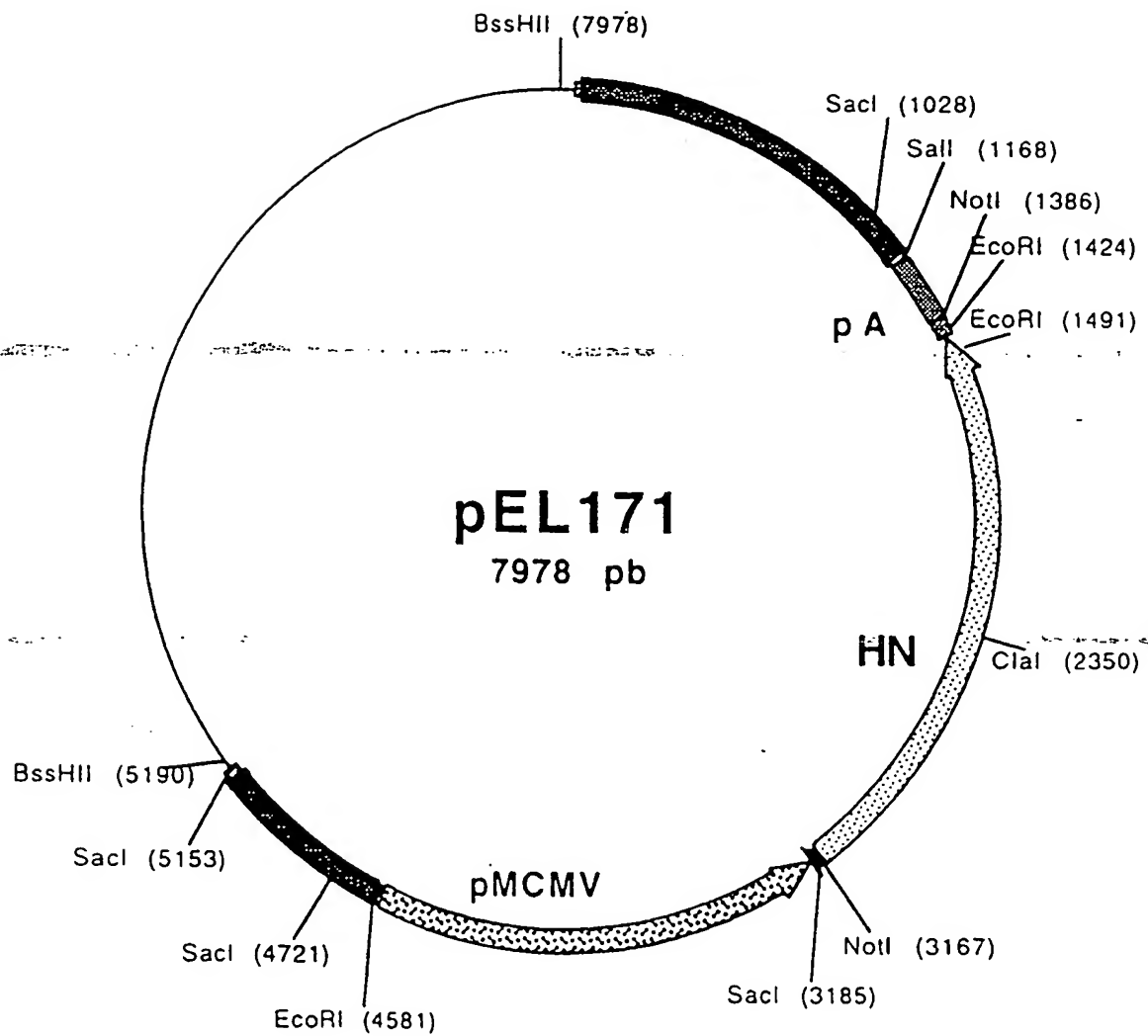
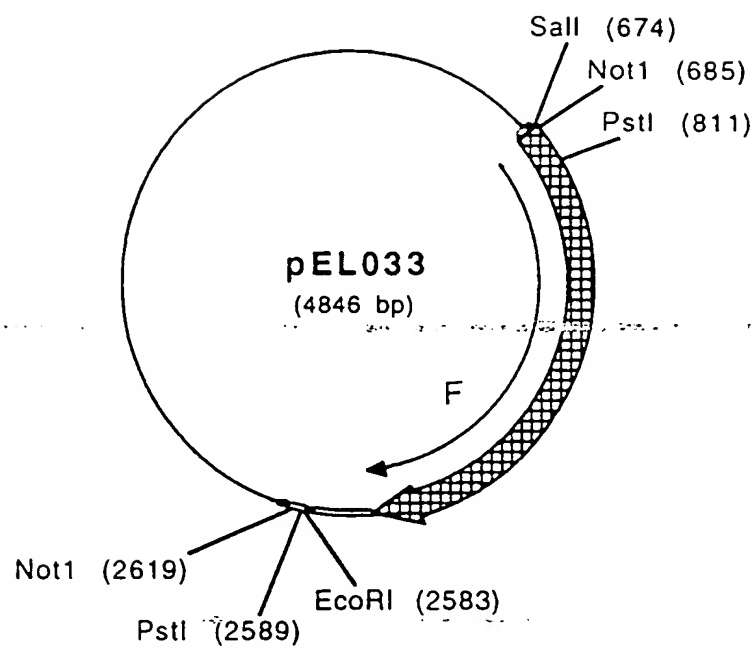


FIG. 11

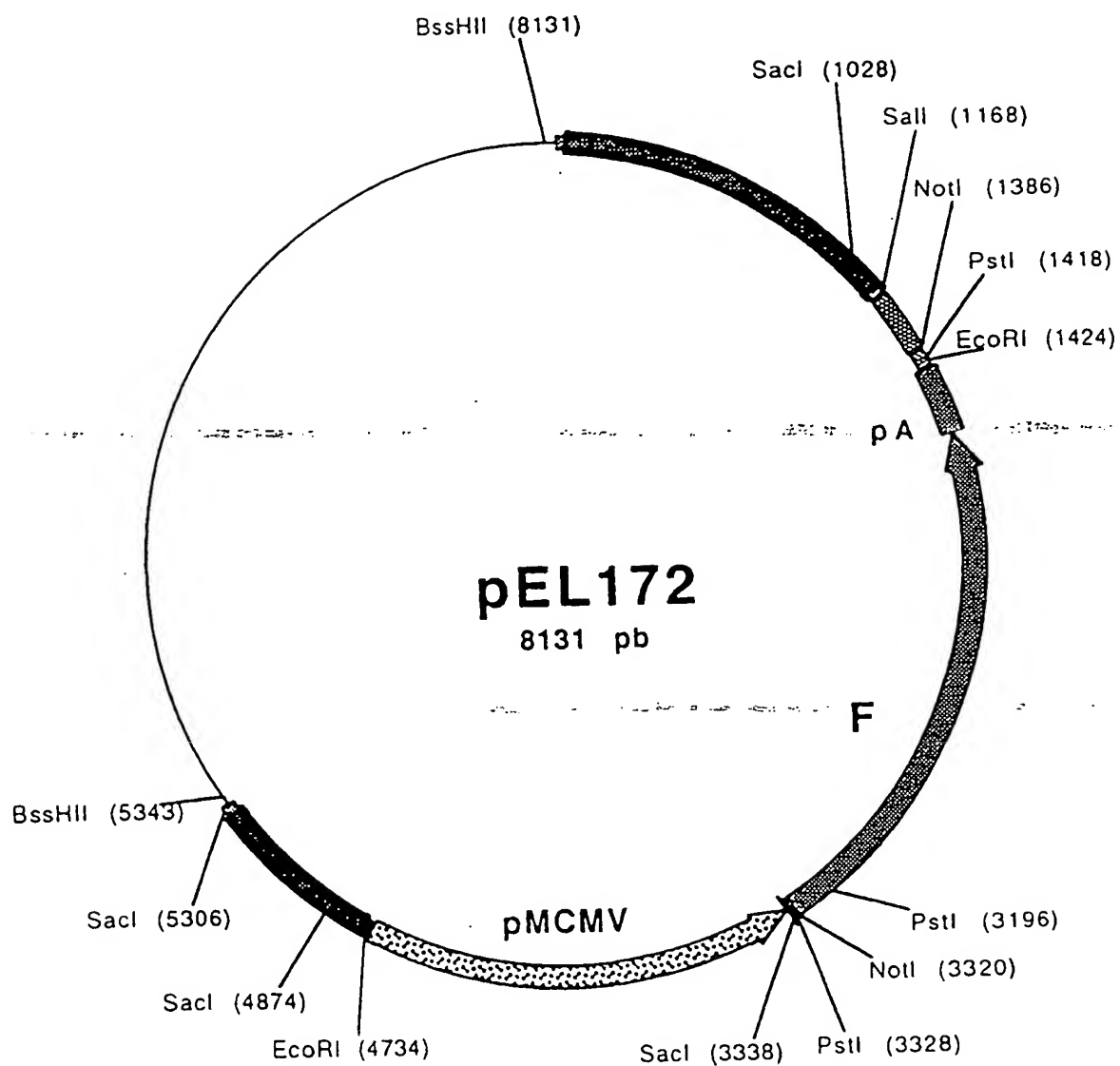
18/25

FIG. 12

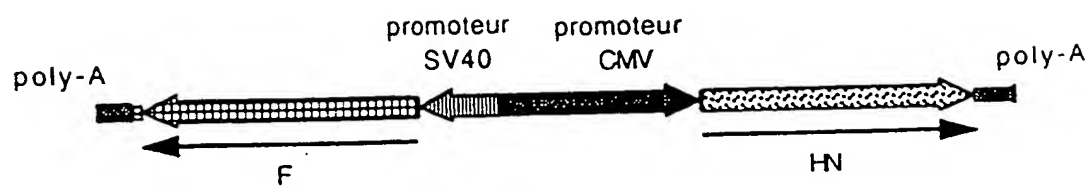
19/25

FIG. 13

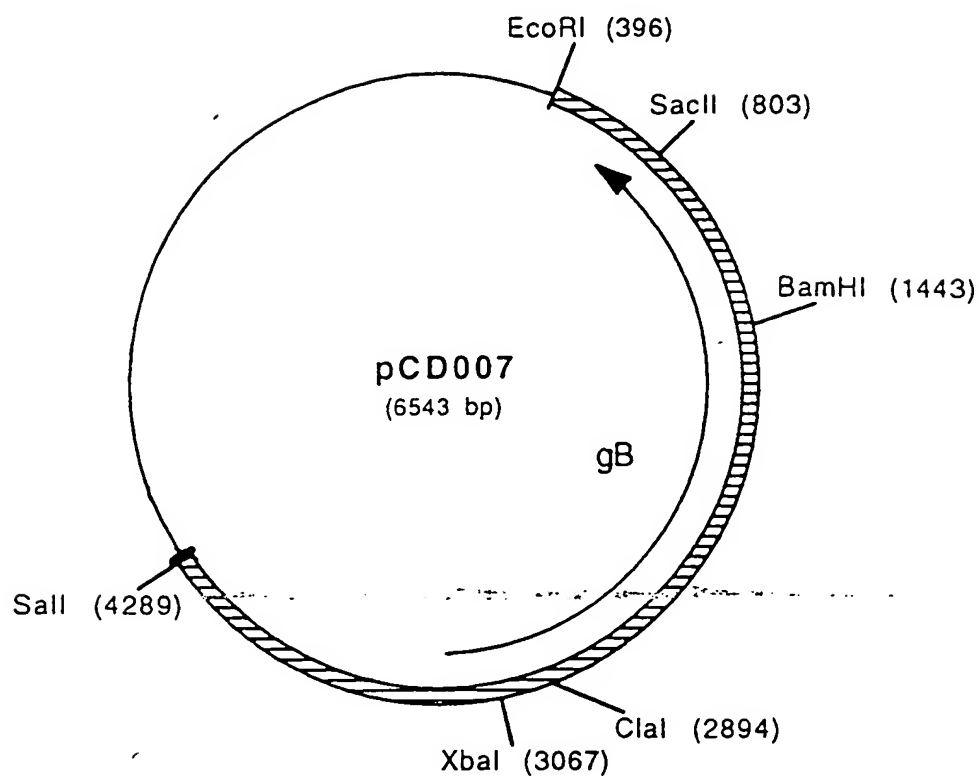
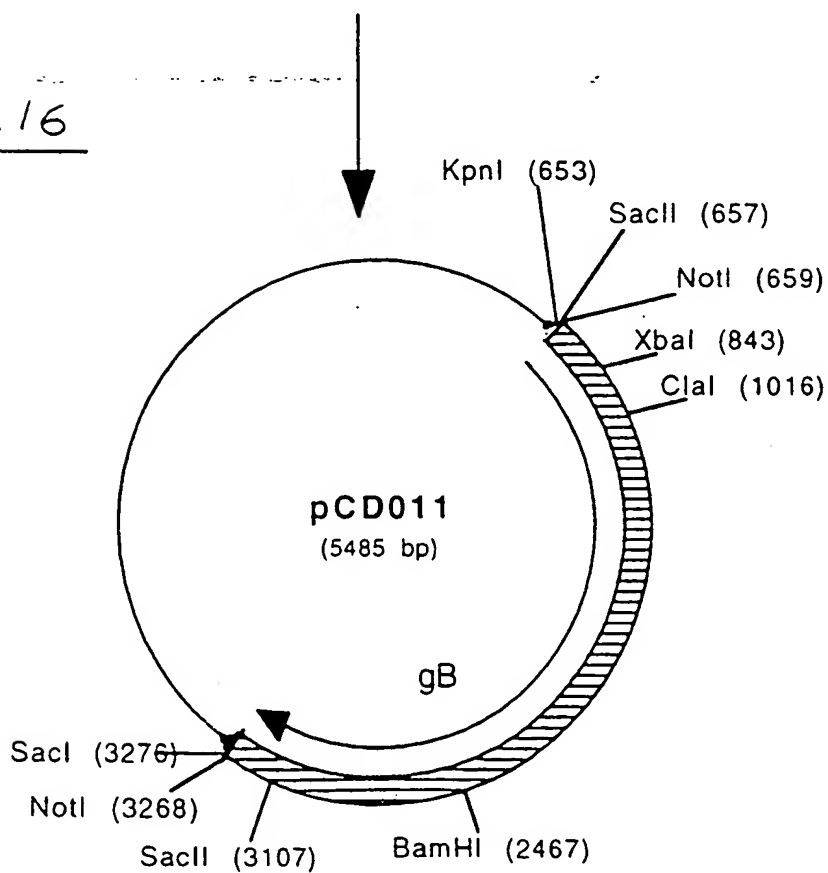
20/25

FIG. 14

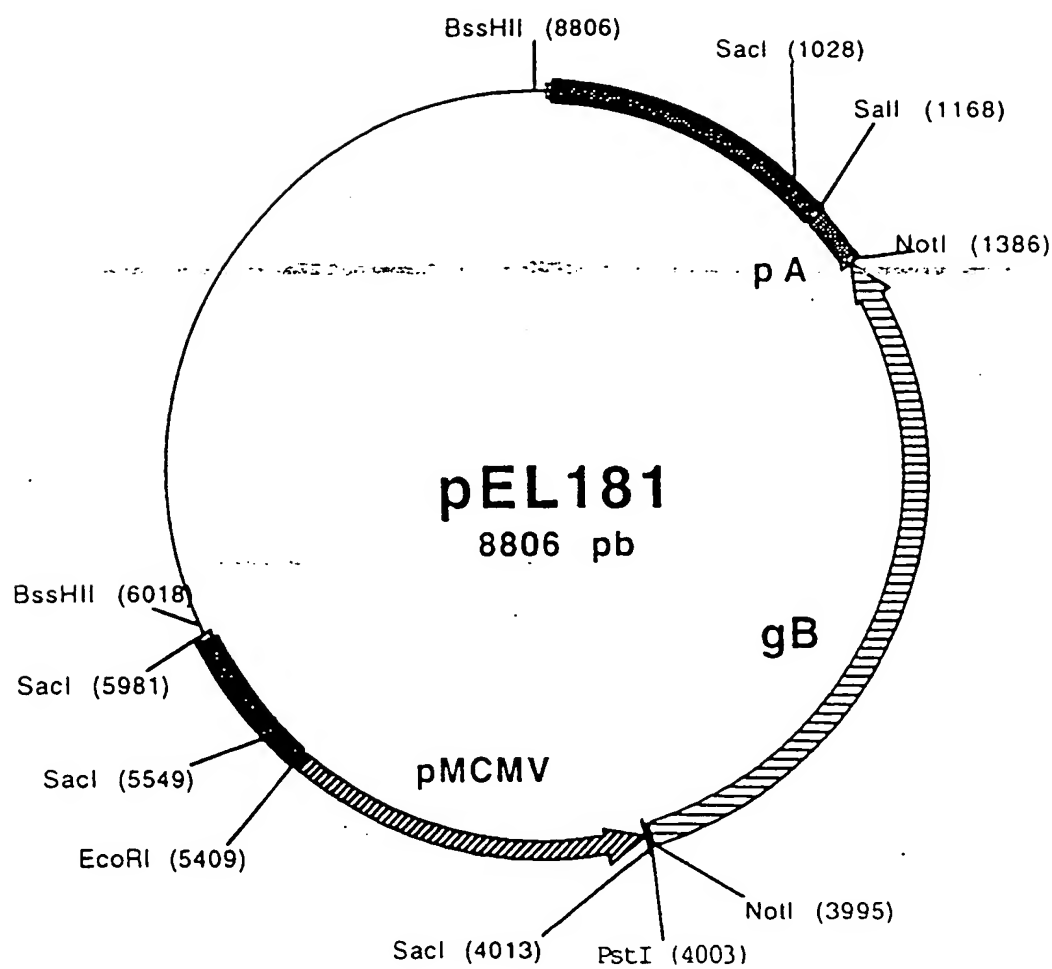
21/25

FIG. 15

22/25

FIG. 16

23/25

FIG. 17

24/25

FIG. 18

EcoRI

(UL53)

1 GAATTC AATCCTGTT CACCAACCCCGCTACATTTAATTCCTT CACTAGTTTATGTCCTC
1▶ *GluPheAsnProValHisGlnProProAlaThrPheAsnSerSerLeuValTyrValLeu*
61 ACAAAATATACACAGCGTCTAAACAAC TACGAGAACCACCAGACGAGATGTGTTAAAGGA
21▶ *ThrLysTyrThrGlnArgLeuAsnAsnTyrGluAsnHisGlnThrArgCysValLysGly*
121 GCTTATTTTGA AATGAGACTGTACTCATTTCTCGTCTGATCCC ACTGGCCAAAGAACAG
41▶ *AlaTyrPheGluAsnGluThrValLeuIleSerArgLeuIleProLeuAlaLysGluGln*
181 TATTCGTCATGGAAGTGGCAGACTGTCTCTTTACATATGGTTTTCC CAGATCAGAGTTGC
61▶ *TyrSerSerTrpLysTrpGlnThrValSerLeuHisMetValPheProAspGlnSerCys*
241 ATTTCCACGGTTATTGTACATATGTTACTTGCTGACCCG TGCCAGAGGCGAATGTTCCGGC
81▶ *IleSerThrValIleValHisMetLeuLeuAlaAspProCysGlnArgArgMetPheGly*
301 TCTGTCTGCCGCGAGAACGCATTGCGATTGGATGCATATCATCTAA ACTACTGGACAGCG
101▶ *SerValCysArgGlyPheAsnAlaLeuArgLeuAspAlaTyrHisLeuAsnTyrTrpThrAla*
361 TTTACTTCGAGGCTGATATTACGGGTGCCATACACAAAGATGCAACGGTTTTTGAGGGAA
121▶ *PheThrSerArgLeuIleLeuArgValProTyrThrLysMetGlnArgPheLeuArgGlu*
421 TTTGAACATGTCCGAGATTGCAAAAGCTTGAAC TACGTAGCAGACCCTCTAGGCTTTTGC
141▶ *PheGluHisValArgAspCysLysSerLeuAsnTyrValAlaAspProLeuGlyPheCys*
481 ATCTGTAATCCAGGGTCTTAGTACTGAAAACACTCGAGATCGGTTTTATATTTAGCATCG
161▶ *IleCysAsnProGlyValLeuValLeuLysThrLeuGluIleGlyLeuTyrLeuAlaSer*
541 CTTATTATGTCCACCATGACATTGCGGATTGCTATGATCCGTGTCATATATTTTACAT
181▶ *LeuIleMetSerThrMetThrLeuArgIleCysTyrAspProCysAlaTyrIleLeuHis*
601 GAACACGTAAAAATTAGTGCTTGGGTATATGTAATTGCTCTCAGCGGTTCTAGAACTCTTA
201▶ *GluHisValLysIleSerAlaTrpValTyrValIleValSerAlaValLeuGluLeuLeu*
661 TCACTGATGGGTTACACGACTCCGGCAAAGACTAAAGTCTCCGCATCGAAACCTCCCAGT
221▶ *SerLeuMetGlyTyrThrThrProAlaLysThrLysValSerAlaSerLysProProSer*
721 ATCTTGACTTCATGCCTTGCCAATATTGCTTCGAGCTTAGTCTTGCGTGCAATTGTGCGTG
241▶ *IleLeuThrSerCysLeuAlaAsnIleAlaSerSerLeuValLeuArgAlaLeuCysVal*
781 GCTGCGATTGCGAGCATTGTAATAATTGCATTTAAATACGAACAGAAGATACAAAACAA
261▶ *AlaAlaIleAlaSerIleValIleIleAlaPheLysTyrGluGlnLysIleGlnAsnLys*
841 TTGTTCCGGCCTTGAACGGCAATAAAATGTTAAACACGTTGTGCGGTGTTGTGTCTGAA
281▶ *LeuPheGlyPro...*
901 TTTGGTCCATTTGAAGACAGCCCTAGTTCTAACGGCTGAGTATCATTTGTTTGAAAGGAGT
961 AACATCTGGCGGTCAGAATGTACAAAGTATACTCGTGGGTGATTTTAGGGCGTGTTCTAC
1021 TAAGCGGATGTTTGCGGTTTAGACGGCATGCCGCACTACATTACGGGATTAAGTTACATG
BamHI
1081 TCGGATCCGCAGAAGTTCTCGCAGATTATTATGTCTGCGTGAATATTTTCGCACCAACTAC
1141 TGGATCGCAATTGTAGTTTGTGGGTTCCAGTGTATGTGTTATGACGTATACTGGGAGTGG
1201 CCCAGACCATTCAAAAGCCAAGTGGATTAGCTCGCAAACAGCGTGCCAGATTACTGTCAG
1261 CTTACCTTTACGACCTGCTCCGAGCTTGACACCTGTTCTGAGTCCGTAGAAGTCTCAAC
1321 CGTTGTGTATGCGGTTTCATTTTTTTTGTGACGTGCACGCGGTACATCAACCCACTGACTGC
1381 GATGGAGACCGGAGAAATCTGGAAGAAATAAAGATAGCGTGAGACACGTTTACAGCATCT
1441 TCAATACAAGTACTCATAGCGAAGCGAGATCAGCAACGGCCCGGACAAAAGATCGCCCTG
BgIII
1501 GATGGCCGTTACCGCTGAGGTCAGAATCCCGCCACGAAGCACATTGTATTCCGCCGCAGAT
1561 CTCATTCTACAGAAAGTAGCTCCAGATCCCGGTTTCATCTGGGCGCGGTACGTCCAAACGA

25/25

FIG. 18 (FIN)

UL54

1621 GTCCGTGATTCAAGTGACAGGGGGCGCCGTCGCTGTTTCAATGGCGAGGCCTCGTTCCCG
1681 TTACGAGAACCAGTCAGGTATGAGCGTACGGTCTTCCATAAGGCGGGTCAGTAGCCCTCG
1741 AAATAAGTTTATGAGAGGCCGTGCGCATATCCAAGTCCGAAGAGGCATCCCCCTAGACC
1801 CAGGCGCCGTGCAGGTACACCAGAAAAGCGATATAGGGCGCCTATCTTTACTGTTTCGTT
1861 GAAGCATTTCGCGCAGGTCTTGGGAAAGAAATCGGGATGAACCTCGAAGACCGATTTCGGAG
1921 AGACTTTGTCCGATGCCCAACGTCATCACGGACCGAAACGAAGGAGTTGCGAAACGTAAC
1981 ACCGGCCCCAATATTTTGAAGGCCGCAACTGCATTTCGGCGGTCTCGGAAAGTGCATTAC
2041 TGAAGAGTTAAGATTAGAAAATCAGAAATGTCTTTTAGACATGGTAAACCGGGCAGTGGA
127

Clal

2101 TGATGATGATTGTGATGATATCGATCGTGATAGAGGAATCTGCTTTCCAGCATTTTGTGTC
2161 TTCGGGATCATCTGACCTTGCAGCCGATGCTGCATTCACTTCGTGGAAGCAGTTTGTGG
2221 GCGCGCAGCTTCACTGAAAGGCCGCTGGACATCGCGTCCGGATATAGCCAGGTTGGCAA
2281 AATTTACAGAGCTGTATATTTGGCGAACTGCTCATTTGAAGAGCTACTTTTTGCATGCGA
2341 TGAGACACTTGTATGGATGCTTTGGCATCAGTTTCAAGATGAAAGGATTTACCCCCACGA
2401 TCCTATCTTCTCTAACATCTACTGCGCATGTCAATCTCTAGCCATGCATCTGGGGCCAAT
247

BglII

2461 CCTGCCGTGTTATCTCTCTAGCATTGGCAGTCAACTAAGAGATACCACTAGATCTCAGGA
2521 GCTATCACTGAGTAGCGCAAAATGTCCTTTAACTTTATTACTGACCTTCTTCGACCGGTT
2581 CTCAAGAATTGTGTATCCGCGATCAGAGGCCATAGTCATGAATCATAAAGCAATAGACCC
2641 GGCCAGAACATTGTGGGACATGTACTATCCTGGGACCTGTTCTAAAAAAATCCCCTCGT
2701 TCTGCGCAGCAGCAAAATGTGTGCCGCAAAGAGGAATGCAGAGTGTTTGTGCCGAGCTC
2761 TAAGCCGAGTATACAGTAGGGAAATTTCTCTTGGGACTTGTTTGACAGTTCTATACAC
2821 CTATCGACACATGGCGGTATTGTATTGGAATTGGTGCCATCCTACGTTTCTGAAGATTGC
387

SacI

2881 CATCTCTGTGACTGGTCAGCAGATGGCGCCGCGAGCTCAATGATGTAAGCGTTCACTGTT
2941 GCAATCCGGCCTTGTAATACTAGTATTAGCACGGTTGAAAATTTTGTAGAAATGTTT
3001 CCCGACTCTCGAAAATTAACGGAGGTATAATAAAGAACACAATACAACGGACACCGACAA
3061 CGTGGAGCATTTTTATTAGTCTGCAAATCCTTGTTGATGAACGTGGTGCCCTGG

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC 6 C12N15/8 A61K35/76 C12N15/38 C12N7/

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 6 C12N A61K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	EP 0 719 864 A (RHONE MERIEUX) 3 July 1996 see column 2, line 40 - column 4, line 38 ---	1-17
A	WO 96 00791 A (THE BOARD OF TRUSTEES OF THE UNIVERSITY OF ILLINOIS) 11 January 1996 see page 1, line 31 - page 2, line 7 see page 4, line 27 - page 5, line 58 ---	1-17
A	WO 92 03554 A (ARTHUR WEBSTER PTY. LTD.) 5 March 1992 see page 6, line 20 - page 8, line 8 see page 30, line 15 - page 32, line 17; figures 5,6 -----	1-17

☐ Further documents are listed in the continuation of box C.☒ Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.

"Z" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

4 June 1998

Date of mailing of the international search report

16/06/1998

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Montero Lopez, B

Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)		Publication date
EP 719864	A	03-07-1996	FR	2728795 A	05-07-1996
			AU	4071595 A	11-07-1996
			CA	2166367 A	01-07-1996
			JP	9020682 A	21-01-1997
WO 9600791	A	11-01-1996	AU	2946395 A	25-01-1996
WO 9203554	A	05-03-1992	NONE		

A. CLASSEMENT DE L'OBJET DE LA DEMANDE

CIB 6 C12N15/86 61K35/76 C12N15/38 C12N7/01

Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB

B. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTE

Documentation minimale consultée (système de classification suivi des symboles de classement)

CIB 6 C12N A61K

Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où ces documents relèvent des domaines sur lesquels a porté la recherche

Base de données électronique consultée au cours de la recherche internationale (nom de la base de données, et si cela est réalisable, termes de recherche utilisés)

C. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
A	EP 0 719 864 A (RHONE MERIEUX) 3 juillet 1996 voir colonne 2, ligne 40 - colonne 4, ligne 38	1-17
A	WO 96 00791 A (THE BOARD OF TRUSTEES OF THE UNIVERSITY OF ILLINOIS) 11 janvier 1996 voir page 1, ligne 31 - page 2, ligne 7 voir page 4, ligne 27 - page 5, ligne 58	1-17
A	WO 92 03554 A (ARTHUR WEBSTER PTY. LTD.) 5 mars 1992 voir page 6, ligne 20 - page 8, ligne 8 voir page 30, ligne 15 - page 32, ligne 17; figures 5,6	1-17



Voir la suite du cadre C pour la fin de la liste des documents



Les documents de familles de brevets sont indiqués en annexe

* Catégories spéciales de documents cités:

"A" document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent

"E" document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date

"L" document pouvant jeter un doute sur une revendication de priorité ou cité pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (telle qu'indiquée)

"O" document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens

"P" document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée

"T" document ultérieur publié après la date de dépôt international ou la date de priorité et n'appartenant pas à l'état de la technique pertinent, mais cité pour comprendre le principe ou la théorie constituant la base de l'invention

"X" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive par rapport au document considéré isolément

"Y" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier

"Z" document qui fait partie de la même famille de brevets

Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée

4 juin 1998

Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale

16/06/1998

Nom et adresse postale de l'administration chargée de la recherche internationale

Office Européen des Brevets, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Fonctionnaire autorisé

Montero Lopez, B

Document brevet cité au rapport de recherche		Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)	Date de publication
EP 719864	A	03-07-1996	FR 2728795 A	05-07-1996
			AU 4071595 A	11-07-1996
			CA 2166367 A	01-07-1996
			JP 9020682 A	21-01-1997
WO 9600791	A	11-01-1996	AU 2946395 A	25-01-1996
WO 9203554	A	05-03-1992	AUCUN	

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ BLACK BORDERS
- ☐ IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- ☐ FADED TEXT OR DRAWING
- ☐ BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING
- ☐ SKEWED/SLANTED IMAGES
- ☐ COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS
- ☐ GRAY SCALE DOCUMENTS
- ☐ LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT
- ☒ REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY
- ☐ OTHER: _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.